

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA

**FACULTAD DE CIENCIAS ECONOMICO
ADMINISTRATIVAS**

**PROGRAMA PROFESIONAL DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



TESIS:

**Evaluación de Dos Dilutores sobre los
Parámetros Macro, Microscópicos y Funcionales
de Semen Conservado de Caninos**

**PRESENTADA POR:
BACHILLER GIANCARLO.V HUERTA CHAVEZ**

AREQUIPA – PERU

2011

DEDICATORIA

La presente tesis quiero dedicar a mis padres Victor y Celinda quienes me brindan u apoyo incondicional para conseguir las metas que me trazo y a todos os docentes y amigos quienes me ayudaron a realizar esta tesis.

Giancarlo Victor Huerta Chavez

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	2
1.1 ENUNCIADO DEL PROBLEMA.....	2
1.2 DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA	2
1.3 JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO	2
1.4 OBJETIVOS.....	4
II. MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL.....	6
2.1 ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO	6
2.2 GAMETOGENESIS EN EL PERRO	17
2.3 PRODUCCIÓN SEMINAL EN EL PERRO.....	21
2.4 CONSERVACIÓN DEL SEMEN CANINO	34
2.5 DILUCIÓN DE EYACULADOS	36
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
3.1 MATERIALES	44
3.2 MÉTODOS.....	46
3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	53
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
V. CONCLUSIONES	68
VI. RECOMENDACIONES.....	70
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	71

RESUMEN

Se diseñó un estudio experimental para realizar la evaluación de dos dilutores sobre los parámetros macro, microscópicos y funcionales de semen conservado de caninos. Para tal efecto se utilizaron 5 caninos adultos sin raza definida, intradomiciliarios, clínicamente sanos y de fertilidad comprobada. De estos animales se obtuvieron 4 muestras seminales las cuales se dividieron 2 alícuotas de 0,5 ml, las mismas que fueron sometidas a dos dilutores, el primero basado en Leche UHT (LUHT) y el segundo basado en Glucosa Citrato (GC), y a 4 horas de evaluación (0, 24, 36 y 48 horas), asimismo, en estas muestras se evaluaron Volumen (ml), Color (blanco lechoso, blanco opalescente), Motilidad (%), Viabilidad (%), Morfología (% de cada categoría), Concentración (espermatozoides por ml), Integridad de membrana (%). Luego del análisis se halló un valor promedio final de volumen de semen de $1,88 \pm 0,30$ ml, correspondiente a la segunda fracción, Con relación al color del semen, el color predominante fue de Blanco lechoso, a excepción de un espécimen que mostró dos muestras de color Blanco Opalescente, en referencia a la concentración de espermatozoides al inicio del estudio, se encontró un valor de $470,48 \pm 47,93 \times 10^6$ células espermáticas, el cual fue considerado normal. Con relación a la motilidad se observó un valor inicial de 95,7%, pero luego de someter las muestras a las horas de evaluación (24, 36 y 48 horas) se apreció una diferencia estadística significativa entre ellas ($P < 0,05$), debido principalmente a un efecto acumulativo del shock hipotérmico, asimismo, no se halló efecto del dilutor entre las horas evaluadas ($P > 0,05$). El efecto de la adición de los dos dilutores sobre el semen canino afectó significativamente ($P < 0,05$) la viabilidad de los espermatozoides en el tiempo, mostrando valores iniciales similares en ambos dilutores (88,65%) y este valor disminuyó progresivamente hasta alcanzar valores de 62,30% en el caso del dilutor en base a leche UHT y 63% para el dilutor glucosa citrato, asimismo, no se halló efecto del dilutor entre las horas evaluadas ($P > 0,05$). Con relación a las anomalías morfológicas, el porcentaje promedio de espermatozoides normales fue de 80%, las anomalías halladas corresponden a la pieza intermedia, donde se han encontrado un porcentaje de 15,7% de gotas citoplasmática proximales y 4,35% de gotas citoplasmática distales. En relación a la integridad de membrana, no se hallaron efectos de los dilutores; sin embargo, durante las horas de evaluación se observa una disminución lineal en el tiempo, estos valores difirieron significativamente ($P < 0,05$), lo cual permite establecer que conforme pasa el tiempo, la integridad de membrana se altera significativamente. El efecto de ambos dilutores sobre los parámetros evaluados fue similar en todos los parámetros evaluados, lo que permitiría

utilizar en forma práctica el dilutor basado en Leche UHT, con las mismas ventajas que el dilutor Glucosa Citrato.



I. INTRODUCCIÓN

1.1. ENUNCIADO DEL PROBLEMA.

Evaluación de Dos Dilutores sobre los Parámetros Macro, Microscópicos y Funcionales de Semen Conservado de Caninos. Arequipa – 2011.

1.2. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

El creciente interés en el perro doméstico como especie de compañía y de trabajo, ha generado un importante incremento en la investigación sobre la biología reproductiva de la especie (Farstad, 1996; Cain, 2001). Uno de los asuntos más investigados ha sido la conservación de gametos, ya sea para ser utilizados en programas de inseminación artificial o para fecundación in vitro (Yamada et al., 1992; Hay et al., 1997; Farstad, 2000; Holt, 2000).

Asimismo, la necesidad de mejorar la propagación de la especie, preservar la línea germinal o aumentar la producción de crías en razas caninas que tengan una baja tasa de fecundación, ha incentivado la investigación de nuevas tecnologías reproductivas. Un segundo ámbito de interés, es que el perro podría ser un modelo de estudio en el laboratorio para mejorar la fecundidad o preservar gametos de especies en peligro de extinción, como el lobo ártico (*Canis lupus*), el lobo de etiopía (*Canis simensis*) o el lobo mexicano (*Canis lupus baileyi*).

1.3. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

1.3.1. ASPECTO GENERAL

La conservación de gametos procedentes de animales de alto valor genético, así como de especies en vías de extinción, constituyen una

invalorable fuente de material genético, tal es el caso de la presente investigación que pretende evaluar el efecto de dos dilutores sobre la evaluación macro, microscópico y funcional de semen refrigerado de caninos.

1.3.2. ASPECTO TECNOLÓGICO

Con la presente investigación se aportará nuevos conocimientos y herramientas para la conservación de semen de caninos, lo cual representará una tecnología innovadora para ser utilizada por los profesionales especializados en caninos..

1.3.3. ASPECTO SOCIAL

La conservación de gametos representa una alternativa para la preservación de material genético de animales de importancia para los propietarios y de especies caninas en vías de extinción para asegurar la progenie de las mismas..

1.3.4. ASPECTO ECONÓMICO

La actual importancia de especímenes caninos de alto valor económico requiere la preservación de su material genético sobre todo en aquellos animales donde la monta natural es un impedimento para su reproducción y el consecuente mantenimiento de una línea en especial. Asimismo, la preservación de gametos de perros de alto valor genético y su propagación, constituye actualmente una opción económica rentable en el mercado local.

1.3.5. IMPORTANCIA DEL TRABAJO

La importancia de la presente investigación radica en validar la utilización de un dilutor que es de fácil preparación, el mismo que podría ser preparado con un mínimo de equipo y con insumos de fácil adquisición en el mercado local. Asimismo, podría ser utilizado en reproductores que tienen defectos físicos para realizar la monta, de igual manera podría ser almacenado bajo refrigeración el semen de estos animales para ser utilizado con posterioridad.

1.4. OBJETIVOS

1.4.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar los parámetros macro, microscópicos y funcionales de semen conservado de caninos sometidos a dos dilutores.

1.4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Valorar los parámetros macroscópicos (color y volumen) de semen conservado de caninos sometidos a dos dilutores.
- Evaluar los parámetros microscópicos (motilidad, viabilidad, morfología y concentración espermática) en semen conservado de caninos sometidos a dos dilutores.
- Determinar la funcionalidad de la membrana plasmática (prueba hiposmótica) de espermatozoides en semen conservado de caninos sometidos a dos dilutores.

1.5. PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS

Dado que el dilutor de Glucosa – Citrato ha demostrado apropiadas respuestas en los parámetros seminales de caninos, es probable que el

dilutor en base Leche Descremada – UHT provea condiciones para una mejor conservación de las células espermáticas, en comparación al dilutor de Glucosa – Citrato, representado por adecuados parámetros de evaluación seminal.



II. MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL

2.1. ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO

El perro de nuestros días tiene como ancestro al lobo y comenzó a formar parte de la vida del hombre hace aproximadamente unos 15.000 años, cuando por motivos alimenticios, se convirtió en carroñero del entorno que rodeaba los asentamientos humanos semipermanentes. De hecho, la hipótesis más probable sería que, hace unas 1.000 generaciones, los cánidos fueron capaces de observar todas las ventajas que les ofrecía vivir alrededor de los campamentos humanos y esto, unido a la sociabilidad de esta especie, les permitiera la supervivencia. Hace unos 12.000 años, el lobo doméstico evolucionó a un perro primitivo que, además de tener menor tamaño y mejor carácter, era más obediente y sociable. Los humanos destinaban estos perros primitivos para diversas funciones (protección de campamentos, colaboración en las cacerías y fuente de alimento cuando escaseaban las presas salvajes), con lo que la presencia de los perros comenzó a tomar importancia en las sociedades humanas (Fogle, 1996).

A lo largo de la historia, la especie canina ha representado un papel importante en la religión, arte, folklore y mitología de algunas culturas, como la China hace unos 4.000 años o la Persa hace unos 2.750 años. Los perros también se han utilizado como símbolo de diversas efemérides, siendo inicialmente los ejemplares destinados a la cacería símbolo de poder, riqueza y prestigio; luego pasaron a ser muy apreciados por la heráldica y, finalmente, comenzaron a formar parte de objetos decorativos. Como otros muchos animales, el perro ha sido muy apreciado como personaje literario, tanto adulto como infantil. Y, desde que el ser humano empezó a disponer de tiempo de ocio, la especie canina destacó por ser un gran entretenimiento para el público

en general, tanto en circos, como cines, etc., además de formar parte de muchas actividades deportivas elegidas por el ser humano (Fogle, 1996).

Antiguamente, la principal función del perro era su uso como animal de trabajo, pero con la evolución que ha sufrido la sociedad moderna, este papel en la actualidad es secundario siendo su labor principal la de animal de compañía. Pero, a diferencia de otras especies domésticas, los perros poseen una gran inteligencia y, sobre todo, una enorme nobleza que lo convierte en una de las pocas especies animales capaces de desarrollar de una forma destacada funciones de guarda, defensa, rastreo, pastor, salvamento, guía o auxiliares, de tiro, de servicio social, además de ser un animal enormemente valioso en concursos de pastoreo, pruebas de campo, , carreras de trineos o concursos de belleza.

Todo ello, explica por sí sólo, cómo una especie que no genera los beneficios económicos que podría aportar un animal de abasto, ha sido capaz de integrarse en la sociedad humana con tanto arraigo, aportando sobre todo afecto y compañía a una sociedad cada vez más independiente y estresada; por otro lado, no hay que olvidar los grandes beneficios económicos y de prestigio que supone la cría de ejemplares, que sobresalen por su belleza y habilidad en las diferentes modalidades de concursos caninos celebrados.

El interés por mejorar la fecundación en canes se centra principalmente en el potencial económico que tienen estos animales. Lo expuesto ha inducido a diseñar diversas metodologías que permiten extender y preservar la capacidad fecundante del semen canino. La refrigeración a 4 °C permite preservar el semen por algunas horas en tanto que la congelación podría preservar espermatozoides por muchos años. La

tasa de preñez al utilizar semen refrigerado varía entre 45 y 65%, y depende de factores como la calidad del semen, el momento de inseminación y el lugar donde se deposite el semen (útero o vagina) (Linde-Forsberg, 1995; Linde-Forsberg, 2001), mientras que la tasa de preñez con semen fresco es alrededor del 84% (Linde-Forsberg y Forsberg, 1989, Linde-Forsberg, 2001). Esta diferencia podría deberse a que los espermatozoides pueden experimentar daños a nivel de la membrana plasmática y probablemente también a nivel del acrosoma durante el proceso mismo de la refrigeración.

El acrosoma es una vesícula de secreción que se encuentra en la cabeza del espermatozoide y contiene numerosas enzimas hidrolíticas. Este organelo tiende a romperse en el proceso de refrigeración y calentamiento teniendo por consecuencia que el espermatozoide pierde su capacidad fecundante (Peña y Linde-Forsberg, 2000).

Se ha observado en bovinos (Wheeler y Seidel, 1987), en humanos (Critser et al., 1987) y en ratones (Fuller y Whittinghan, 1987) que los espermatozoides sometidos a algún proceso de preservación en el tiempo, como la refrigeración y el congelamiento, penetran en los ovocitos en un tiempo menor (Watson, 1995). En el caso de espermatozoides caninos se evidencia un cambio en el tiempo para que ocurra la capacitación, probablemente debido también al proceso de refrigeración.

2.1.1. ANATOMÍA DEL APARATO REPRODUCTOR MASCULINO EN LA ESPECIE CANINA

2.1.1.1. Testículos

Los testículos representan el órgano reproductivo principal del macho. Su función es doble, porque además de producir los gametos masculinos (espermatozoides), generan una serie de

hormonas esteroideas. La principal diferencia con los órganos genitales femeninos es que todos los gametos potenciales no están presentes desde el nacimiento, sino que las células germinales masculinas sufren continuas divisiones durante toda la vida reproductiva del animal (Hewitt, 2000).

En todas las especies animales, con independencia del sexo final del embrión, en el feto las gónadas primitivas migran hasta situarse cerca de los riñones. En este estadio es imposible diferenciar un testículo de un ovario, y sólo cuando puede establecerse esta diferenciación es cuando empieza a desarrollarse el epidídimo y el conducto deferente (Hewitt, 2000; Vázquez et al., 2000).

En las diferentes especies domésticas está perfectamente establecido que los testículos descienden hasta el escroto a una determinada edad; sin embargo, en la especie canina no hay unanimidad a la hora de determinar cuáles son las condiciones necesarias para que los testículos se sitúen en el escroto. La teoría más ampliamente aceptada es que los testículos atraviesan el canal inguinal alrededor del cuarto día de vida (Allen, 1992) y se localizan en el interior del escroto entre los 10-14 días tras el nacimiento (Burke, 1986). No obstante, en otros estudios se defiende que el descenso testicular puede completarse durante el estadio fetal y prolongarse hasta los 6-8 meses de edad sin que ello represente una patología (Hewitt, 2000). El testículo debe migrar por el canal inguinal hasta el escroto; este fenómeno se produce cuando se desarrolla en el polo caudal del testículo un cordón mesenquimatoso, de apariencia gelatinosa, que se extiende desde la pared inguinal del feto hasta el testículo del

lado correspondiente y que recibe el nombre de gubernáculum (Ruberte y Sautet, 1998; Sandoval, 2000). Cuando se termina el desplazamiento del testículo, el gubernáculum sufre una degeneración. La finalidad de esta migración es depositar al testículo en el interior del escroto envuelto por una bolsa de peritoneo que es la túnica vaginal (Hewitt, 2000), para finalmente adquirir una posición intraescrotal normal (Allen, 1992). Cuando el descenso testicular no se completa, quedando uno o ambos testículos retenidos a nivel inguinal o abdominal, se desarrolla una alteración patológica denominada criptorquidia, situación relativamente frecuente en la especie canina (Batista et al., 2000).

La morfología del testículo es ovoide y el eje mayor se encuentra en posición longitudinal (Allen, 1992). Aunque la especie canina presenta una gran variedad de formas y tamaños, se acepta que el tamaño medio de los testículos de un perro de raza mediana es 3 x 2 x 1.5 cm, existiendo una relación entre la masa corporal y el tamaño testicular (Hewitt, 2000; Johnston et al., 2001). El testículo se encuentra constituido básicamente por una masa parenquimatosa perfectamente mantenida por un armazón o estroma de tejido conectivo fibroso, cuya fracción más densa y compacta es la túnica albugínea. Esta estructura parenquimatosa también representa el soporte necesario para los plexos nerviosos y el sistema vascular responsable de la nutrición del órgano (Ruberte y Sautet, 1998; Vázquez et al., 2000).

Desde la túnica albugínea se proyectan una serie de septos hacia el interior del testículo, cuya función es la de separar a los lobulillos parenquimatosos. Estos lobulillos confluyen hacia

el centro del testículo, a nivel del mediastino, y su función es sustentar la rete testis (Sandoval, 2000). La rete testis está formada por una serie de conductos anastomosados a nivel del mediastino, que se interponen entre los túbulos seminíferos y los conductillos eferentes que, a nivel de la cabeza del epidídimo, confluyen en el conducto epididimario (Christiansen, 1984). El parénquima se reagrupa en los espacios interseptales como lobulillos testiculares y cada uno de ellos está constituido por un pequeño número de túbulos seminíferos y de tejido intersticial (Sandoval, 2000). La espermatogénesis tiene lugar en los túbulos seminíferos que vierten los espermatozoides a la rete testis para conducirlos hasta el epidídimo que se encuentra en el exterior del testículo (Allen, 1992). Los túbulos seminíferos comienzan en la periferia del lobulillo intersticial como túbulos contorneados, largos y muy tortuosos y se transforman en túbulos seminíferos rectos antes de terminar en la rete testis.

Adyacentes a la membrana basal de los túbulos seminíferos existe una densa capa de células espermatogénicas mantenidas por otras células no germinales que son las células de Sertoli (Sandoval, 2000). El tejido intersticial, donde se sitúan las células de Leydig que se encargan de sintetizar la testosterona, constituye la fracción extratubular del parénquima testicular y se agrupa en lóbulos adyacentes (Hewitt, 2000; Sandoval, 2000; Vázquez et al., 2000).

2.1.1.2. Epidídimo

Es un conducto de gran longitud que se encuentra fuertemente enrollado sobre sí mismo. Se estructura de tal forma que pueden distinguirse tres porciones (Allen, 1992) perfectamente diferenciadas entre sí:

- Cabeza: situada en el borde cráneo-lateral del testículo y difícilmente puede palpase.
- Cuerpo: se sitúa sobre la superficie dorso-lateral y tampoco es posible su palpación.
- Cola: se localiza sobre el polo dorso-caudal, se palpa fácilmente en un perro sano normal y es una pequeña protuberancia.

La estructura anatómica más relevante desde el punto de vista reproductivo es la cola del epidídimo, ya que actúa como reservorio de espermatozoides hasta que se produce la eyaculación y desemboca en una estructura tubular recta que es el conducto deferente que también cumple funciones de almacenamiento de espermatozoides (Ruberte y Sautet, 1998; Hewitt, 2000).

Los espermatozoides maduran a lo largo de su paso por el epidídimo; en la especie canina, este período es de aproximadamente 14 días (Allen, 1992). Diversos autores describen la presencia de unas células llamadas espermiófagos en el testículo y en el propio epidídimo, cuya función sería la de fagocitar a los espermatozoides no eyaculados facilitando así su destrucción y posterior reabsorción (Illera, 1984).

4.1.3. Cordón espermático

Es una estructura que discurre entre el testículo y la pared abdominal. Está constituido por cuatro componentes (Allen, 1992; Hewitt, 2000):

- Conducto deferente: esta estructura discurre por el interior del saco vaginal y se encarga del transporte espermático desde el epidídimo hasta la uretra. Se dirige dorsalmente y penetra en la

cavidad abdominal junto con el cordón espermático; a partir de aquí se sitúa cranealmente al uréter y desemboca en la uretra a nivel de la próstata craneal.

- Músculo cremaster: procede del músculo oblicuo abdominal interno situado cerca del anillo inguinal externo y se une a la túnica vaginal en el testículo. Se encarga de modificar la distancia desde los testículos al abdomen para producir una correcta termorregulación.
- Arteria espermática o testicular: discurre a través del plexo pampiniforme y se encarga de transportar sangre desde la aorta hasta el testículo.
- Vena espermática o testicular: esta vena se divide en un complejo de pequeñas venas (plexo pampiniforme) en el interior del cordón espermático, rodeando en este nivel a la arteria espermática. Su función es la de garantizar el retorno sanguíneo desde el testículo a la vena cava y secundariamente, como la sangre que regresa es fría, se garantiza una reducción de la temperatura de la sangre arterial que evita un calentamiento excesivo del testículo.

4.1.4. Glándulas accesorias

4.1.4.1. Próstata

Es una glándula simétrica, bilobulada mediante un septo intermedio. Representa la única glándula que anatómicamente es significativa en el perro y se localiza en el borde craneal de la pelvis. La uretra atraviesa completamente la pelvis para llegar a la base del pene, sin embargo, los conductos deferentes únicamente atraviesan una pequeña porción de la glándula antes de penetrar dorsalmente en la uretra. El tamaño prostático es tremendamente variable en función del peso, raza y edad del animal (Allen, 1992; Hewitt, 2000). En los perros, la próstata es la encargada de

producir tanto la primera como la tercera fracción del eyaculado; para un perro de raza mediana, el volumen medio de secreción es de 1-2 ml para la primera fracción y de 2-4 ml la tercera (Burke, 1986). No obstante, en función de las razas caninas, se describen volúmenes de 0.1-2 ml para la primera fracción y de 1-30 ml para la tercera (Iguer-ouada, 2001). El tiempo que tarda en expulsarse la primera fracción oscila entre 30 segundos y 1 minuto (Allen, 1992), mientras que la tercera tiene un tiempo de eliminación que varía en torno a los 3-30 minutos, debido a su mayor aportación al eyaculado (Arthur, 1991). La función de la primera fracción es la de limpiar la uretra de los posibles restos de orina, mientras que la tercera es la encargada de aportar volumen al eyaculado asegurando de esta forma el ascenso de los espermatozoides por la vagina; asimismo, ambas fracciones cumplen una función bactericida (Allen, 1992).

4.1.4.2. Ampolla

Aunque no tiene significado anatómico en el perro, cabe destacar que actúa como reservorio de espermatozoides en el conducto deferente antes de desembocar en la uretra (Hewitt, 2000).

4.1.5. Uretra, Pene y Prepucio

4.1.5.1. Uretra

Es un conducto cuya misión es la de transportar tanto la orina como el semen. Se inicia en el cuello de la vejiga urinaria y se dirige caudalmente por el suelo de la pelvis atravesando la próstata; en este nivel, desembocan los conductos deferentes sobre su superficie dorsal.

Caudalmente al isquion, la uretra penetra en el pene y discurre sobre su cara caudoventral, introduciéndose por el surco

ventral del hueso peneano (Allen, 1992; Ruberte y Sautet, 1998).

4.1.5.2. Pene

El pene posee un sustrato vascular de tejido eréctil (cavernoso y esponjoso) que garantiza la erección necesaria para la cópula. Además, también es el responsable de la forma y del grado de desarrollo del órgano genital; concretamente, en el perro presenta una gran cantidad de tejido eréctil (Allen, 1992; Hewitt, 2000; Sandoval, 2000).

En el pene se distinguen tres porciones bien definidas:

- Raíz del pene: es el extremo proximal del pene. Presenta dos pilares que se insertan en la superficie caudal del arco isquiático a cada lado de la sínfisis. Cada uno de los pilares se continúa con un cuerpo cavernoso que rápidamente confluyen entre sí para formar el cuerpo del pene. La uretra se localiza centralmente al cuerpo, rodeada por el cuerpo esponjoso del pene que es una continuación del bulbo uretral que se sitúa entre los pilares (Frandsen y Spurgeon, 1995; Sandoval, 2000).
- Cuerpo del pene: se sitúa entre la convergencia de los pilares y el glande. Su base anatómica son los cuerpos cavernosos. En el perro es corto, cilíndrico y poco aparente debido al escaso desarrollo de los cuerpos cavernosos (Sandoval, 2000).
- Glande del pene o *glans penis* (Allen, 1992; Sandoval, 2000) comienza en la unión con la mucosa prepucial y consta de:

- Bulbo peneano: es difícil de observar si no hay erección. Está constituido por tejido esponjoso, siendo una característica de la especie canina que la mayor cantidad de cuerpo esponjoso se encuentre formando parte del bulbo. En el momento de la erección, el bulbo adopta una forma más o menos esférica que se localiza en el cuarto proximal del pene cerca de la región testicular, siendo el responsable del acoplamiento del pene en el interior de la vagina en el momento del coito.
- Porción larga del pene: es cilíndrica en todo su trayecto y constituye las tres cuartas partes distales del glande. Termina de forma acuminada en la abertura de la uretra, pero previamente presenta un rudimento de corona.
- Hueso peneano: es una osificación del extremo distal del cuerpo cavernoso. Se sitúa en el interior del glande, es ancho proximalmente y más estrecho distalmente, presentando un surco ventral donde se aloja la uretra. Junto al tejido esponjoso que lo rodea, es el que determina el tamaño del glande del pene en el perro.

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. Para que este fenómeno ocurra se genera una vasodilatación arterial por estímulo de los nervios erectores del plexo pélvico y una reducción del drenaje venoso, motivado en parte por la compresión de las venas dorsales del pene entre el arco isquiático y el pene al contraerse los músculos isquiocavernosos (Ruberte y Sautet, 1998). En el momento de la erección, el pene aumenta de diámetro y de longitud debido a la gran cantidad de tejido eréctil que posee. El bulbo del pene finaliza su erección

completa después que la del glande debido a que es necesario la presión que ejercen los músculos de la vulva y la vagina sobre el bulbo del pene, evitando así que los animales puedan separarse durante el coito hasta que el pene vuelva a ponerse flácido tras la eyaculación (Christiansen, 1984; Frandson y Spurgeon, 1995).

4.1.5.3. Prepucio

El prepucio cubre completamente al pene cuando no se encuentra erecto. Su cara externa se encuentre revestida por la piel e internamente está formado por una mucosa que se continúa con la mucosa del glande peneano o glans penis (Allen, 1992).

4.2. GAMETOGÉNESIS EN EL PERRO

4.2.1. Espermatogénesis

La gametogénesis comienza ya en el estadio fetal donde las células primordiales se diferencian en gonocitos que sufrirán procesos de mitosis tanto durante la vida fetal como en la prepuberal; a este nivel, es cuando se diferenciarán en espermatogonias, momento en el cual se detiene el desarrollo de las células germinales a nivel de los túbulos seminíferos, hasta que comience la pubertad (Allen, 1992; Hewitt, 2000).

El proceso de formación de los espermatozoides en los túbulos seminíferos comienza aproximadamente a los 4 meses de edad y dura unas 8 semanas (McDonald y Pineda, 1989), si bien, la aparición de los primeros espermatozoides en el eyaculado no se define hasta los 10-12 meses de edad. No obstante, hay autores que definen que las células de Leydig no completan su maduración hasta los 5 meses, pudiendo encontrar

espermatozoides en los túbulos seminíferos sobre los 6-7 meses de edad (Hewitt, 2000). La espermatogénesis se ve alterada cuando la temperatura testicular es muy alta, por lo que se dispone de una serie de estructuras (saco escrotal, músculo cremaster, músculo dartos, vasos sanguíneos en el cordón espermático) que garantizan la temperatura idónea para que este proceso pueda tener lugar, ya que a la temperatura fisiológica del animal es imposible (Allen, 1992; Hewitt, 2000).

4.2.2. Espermatocitogénesis

Representa la primera fase de la espermatogénesis y consiste en la producción cíclica de espermatoцитos primarios. Aparte de las células en división, hay presente una reserva de espermatogonias en estado de latencia que son extremadamente resistentes a las agresiones por radiaciones y toxinas, pudiendo incluso sobrevivir a traumatismos graves en los testículos (Allen, 1992; Hewitt, 2000). Está descrito que en la especie canina, cada espermatogonia es capaz de producir un total de 64-96 espermatozoides (McDonald y Pineda, 1989).

Estas espermatogonias, que son las células precursoras de los espermatozoides, se localizan en la membrana basal de los túbulos seminíferos y sufren procesos de mitosis para generar los espermatoцитos primarios que, posteriormente, sufrirán procesos de meiosis para dar lugar a los espermatoцитos secundarios. Finalmente, los espermatoцитos secundarios se convertirán en espermátidas esféricas que ya contienen la mitad de cromosomas (Allen, 1992; Hewitt, 2000).

4.2.3. Espermiogénesis

En esta fase, las espermátidas esféricas se transforman en espermátidas maduras que serán liberadas al lumen de los túbulos seminíferos como espermatozoides (Allen, 1992). Para que ocurra la transformación es necesario que ocurra un complejo reagrupamiento de los orgánulos de la espermátidas maduras que darán lugar a los espermatozoides. Básicamente, el núcleo pasa a ser la cabeza, el aparato de Golgi generaría el acrosoma y por último, las mitocondrias y los centriolos darán lugar al desarrollo de la cola. Las células de Sertoli, que se sitúan sobre la membrana basal de los túbulos seminíferos, retienen la mayor parte del citoplasma; de esta forma, participan en la regulación del paso de espermátidas maduras a espermatozoides (Allen, 1992; Hewitt, 2000).

4.2.4. Espermiación

Esta fase simplemente consiste en la liberación de los espermatozoides desde el compartimento basal de los túbulos seminíferos hasta el lumen (Allen, 1992; Hewitt, 2000).

4.2.5. Morfología del espermatozoide

El espermatozoide es una célula altamente especializada que ha evolucionado para desarrollar una única función: fecundar al óvulo. Presenta a nivel de la cabeza una serie de mecanismos encargados de garantizar la penetración del ovocito y transmitirle así el material genético; por otro lado, la cola posee una maquinaria metabólica encargada de dotar de movimiento al espermatozoide (Illera, 1984). Estructuralmente se diferencian en el espermatozoide:

a) Cabeza: en su interior se sitúa el núcleo y recubriendo su polo craneal se encuentra el acrosoma con las enzimas

acrosómicas (Hewitt, 2000). La extensión del núcleo es de un tercio de la longitud total de la cabeza (Frandsen y Spurgeon, 1995). El acrosoma es un saco membranoso invertido que contiene un complejo lipoglicoprotéico específico que incluye una serie de enzimas, tales como la hialuronidasa y acrosina. La primera de ellas se encarga de degradar los mucopolisacáridos y es posible que provoque la dispersión del cúmulus oóforos del ovocito. En cambio, la segunda facilita la penetración del espermatozoide a través de la zona pelúcida del ovocito (Illera, 1984).

b) Segmento o pieza intermedia: formado por las mitocondrias que se alinean extremo con extremo en bandas que se enrollan en espiral para formar una hélice y cuya función es la de garantizar el metabolismo del espermatozoide y asegurar su movilidad (Frandsen y Spurgeon, 1995; Hewitt, 2000).

c) Cola: gracias a su movimiento flagelar permite el movimiento del espermatozoide (Hewitt, 2000). De dos centriolos situados en la porción terminal de la pieza intermedia parten una serie de fibrillas hacia la cola, presentando dos fibrillas centrales rodeadas de un anillo de nueve pares periféricos de fibrillas contráctiles, responsables del movimiento del espermatozoide (Frandsen y Spurgeon, 1995).

Los espermatozoides del perro y el gato presentan una cabeza aplanada y en forma de espada, siendo esta morfología similar a los de humano, toro y conejo (Hewitt, 2000). Los espermatozoides maduros presentan un citoplasma escaso que es un resto del citoplasma de las espermátidas. Esta pequeña cantidad de citoplasma representa la gota

citoplasmática presente en los espermatozoides cuando abandonan el epitelio germinal para posteriormente perderse por su paso por el epidídimo (Illera, 1984).

Se han realizado una serie de estudios para establecer las medidas de los espermatozoides caninos. Así, se obtuvieron como valores medios (\pm sem) los siguientes: longitud total, $68 \pm 0.3 \mu\text{m}$; longitud de la cabeza, $7 \pm 0 \mu\text{m}$; ancho de la cabeza, $5 \pm 0.1 \mu\text{m}$; longitud de la pieza intermedia, $11 \pm 0.2 \mu\text{m}$; y la longitud de la cola, $50 \pm 0.3 \mu\text{m}$ (Hewitt, 2000).

4.2.6. Transporte del semen

A su llegada a la cabeza del epidídimo los espermatozoides son inmaduros y símbolo de ello es la gota citoplasmática residual que presentan en el cuello. La maduración ocurre durante el avance a través del cuerpo y la cola del epidídimo. No está claro cómo se produce este avance, parece ser que está propiciado posiblemente por la constante producción de espermatozoides por parte del testículo (Allen, 1992), aunque otros autores sostienen que es resultado del peristaltismo existente a lo largo del epidídimo (Hewitt, 2000). La maduración es un proceso que dura unas 2 semanas, incluidas dentro de las 8 semanas que dura la espermatogénesis. En el momento en que el espermatozoide penetra en el conducto deferente, la gota citoplasmática se desplaza hacia el extremo distal de la pieza intermedia o bien es expulsada considerándose en este momento al espermatozoide como maduro.

4.3. PRODUCCIÓN SEMINAL EN EL PERRO

4.3.1. Métodos y frecuencia de recogida

4.3.1.1. Métodos

I. Recogida manual o digital

Es el método más utilizado en la especie canina y consiste en la estimulación manual del bulbo del pene. En la mayoría de los trabajos se recomienda la presencia de una hembra en celo, perfectamente inmovilizada para permitir que el macho olfatee la región vulvar y conseguir una estimulación que facilite la recogida. Cuando no se dispone de esta hembra, muchos autores recomiendan el uso de gasas o algodón impregnados en secreciones vaginales de una hembra en celo, ya que pueden congelarse y descongelarse 15 minutos antes de su uso. En el caso de que tampoco tengamos esta última posibilidad, se puede recurrir a disponer de una hembra sumisa e incluso de un macho castrado y, si fuese posible, se les impregna la cola con secreciones de hembra en celo. Finalmente, 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 contemos con la presencia de una hembra en celo (Burke, 1986; Allen, 1992).

En cualquier caso, el procedimiento consiste en estimular el bulbo del pene y una vez que se haya conseguido aumentar su tamaño en un 40-50% (Burke, 1986), se exterioriza el bulbo fuera del prepucio para garantizar una rotación del pene de 180°. Una vez 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 (Farstad, 2000a; Kutzler, 2005a). La erección del pene se produce porque los impulsos nerviosos generan una dilatación de las arterias pudendas interna y externa del cuerpo

cavernoso del pene. La contracción de los músculos isquiouretrales impide el retorno venoso a través de los cuerpos cavernosos. Por lo tanto, la erección ocurre debido a la retención sanguínea que genera el aumento de volumen del bulbo del pene, el alargamiento del glande y el incremento de tamaño de la porción larga del glande alrededor del hueso peneano (Kutzler, 2005a).

La eyaculación acontece por la estimulación de los nervios simpáticos y, una vez que comienza, se rota el pene en sentido caudal; con esta rotación se consigue, además de simular lo que sucede en una monta natural, una oclusión de la vena emisaria del glande que impide que se genere una disminución de la erección. Se recomienda no realizar la rotación antes de este momento porque se podría generar una detumescencia del pene y por consiguiente una pérdida de la erección (Kutzler, 2005a). Las tres fracciones del eyaculado se recogen por separado en tubos calibrados de plástico o de cristal a 37 °C (Burke, 1986; Allen, 1992; Kutzler, 2005a).

II. 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 (Peña, 1997). Aunque es una técnica válida de recogida, en la especie canina hay estudios que han demostrado que la cantidad y la calidad del semen recogido mediante estimulación manual es mucho mejor

(Arthur, 1991), además de que es una técnica más complicada de aplicar y que el contacto prolongado del semen con el látex puede resultar tóxico para los espermatozoides (Arthur, 1991) e incluso provocar su completa inmovilidad (Allen, 1992; Kutzler, 2005a). Como el látex resulta tóxico, hay autores que recomiendan utilizar guantes de vinilo o incluso polvos de talco que afectan escasamente a la motilidad (Kutzler, 2005a).

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 (Burke, 1986; Allen, 1992). Es posible retirar el pene sin que se haya eliminado completamente la tercera fracción, pero debe hacerse con cuidado para evitar provocar laceraciones e infecciones. Otra complicación que puede ocurrir es el hecho de que se produzcan quemaduras en el pene debido a agua excesivamente caliente en la vagina. Todos estos inconvenientes pueden provocar un detrimento de la libido para recogidas sucesivas (Burke, 1986).

III. Cono de látex

Es una variante de la técnica anterior, pero en la que solamente se utiliza un embudo o cono de látex al que se encuentra unido un tubo colector graduado a 37 °C cubierto de una envoltura protectora. El cono se sitúa justo encima del bulbo del pene para conseguir una compresión enérgica y provocar así la eyaculación. Este método dificulta la separación de las tres fracciones del eyaculado y, además, el látex puede ser tóxico para los espermatozoides (Allen, 1992; Peña, 1997;

Threlfall, 2005). En algunos trabajos se recomienda su uso para animales principiantes o inexpertos, donde las fracciones son difícilmente identificadas, porque es más relajante para el animal (Kutzler, 2005a).

IV. Electroeyaculador

El equipo está constituido por un electrodo bipolar y una fuente variable de corriente alterna. Su funcionamiento consiste en colocar el electrodo en el recto justo encima de las glándulas accesorias y conseguir estimular de esta forma a los nervios que controlan el sistema reproductivo (Howard et al., 1986; Bearden y Fuquay, 1997; England, 1999). Generalmente las sesiones constan de tres series de 30-40 estímulos/serie. Los estímulos se aplican siguiendo un patrón de 3 segundos de estímulo seguido de 3 segundos de parada, aumentando el voltaje desde 0-10 voltios, situándose el rango normal entre 2-5 voltios (Howard et al., 1986).

Este método se cita como una técnica eficaz para la obtención de semen en cánidos salvajes como el lobo o el zorro, pero no se considera un método óptimo de recogida habitual en perro porque se desconoce hasta que punto afecta a la libido del animal (Howard et al., 1986).

Sin embargo, en algunos trabajos se ha comprobado que la concentración y la motilidad espermática no difiere entre semen obtenido por estimulación manual y mediante electroeyaculación (Kutzler, 2005a).

V. Recogida seminal utilizando fármacos

Si bien se ha comprobado que el uso combinado de xilacina e imipramina es capaz de generar una recogida seminal,

presenta el inconveniente de ser una eyaculación de tipo pasivo por lo que gran cantidad de espermatozoides pasan a la vejiga urinaria y cuando se eyaculan están muertos, probablemente porque las muestras se contaminan con la orina (Kutzler, 2005a).

VI. Obtención del semen del epidídimo

Se ha descrito que tras una orquidectomía rutinaria, se puede obtener semen a partir del epidídimo. Los testículos se introducen en solución de tampón de fosfato sódico (PBS) a temperatura ambiente; posteriormente se procede a la disección y apertura de la cola del epidídimo y de los conductos deferentes, y finalmente se añade suero salino y soluciones tamponadas a la suspensión espermática para conseguir un volumen y unos nutrientes necesarios para que los espermatozoides puedan moverse (Hewitt et al., 2001). Asimismo, los espermatozoides presentes en el epidídimo pueden obtenerse realizando un lavado y una separación en dos pasos mediante un gradiente de Percoll discontinuo (Hishinuma y Sekine, 2004).

4.3.1.2. Frecuencia de recogida

No hay unanimidad a la hora de establecer unos patrones de recogida seminal en el perro. Hay autores que realizan recogidas de 3-4 eyaculados totales/ perro a la semana con una distribución de 2-3 recogidas semanales (Hay et al., 1997^a). Sin embargo, en otros trabajos se defiende que es posible mantener una frecuencia de recogida de 2 eyaculados/perro cada 2 días, sin que se observe un marcado descenso de la calidad seminal (England, 1999).

La mayoría de los autores recomiendan utilizar sólo el primer eyaculado, tanto para inseminar como para la refrigeración y/o la congelación seminal. Sin embargo, hay estudios en los que se trabaja con los dos eyaculados, con un intervalo de tiempo de 45-75 minutos entre el primer y el segundo eyaculado (England, 1993; Peña y Linde-Forsberg, 2000a, b), sin observar un descenso evidente de la calidad seminal.

4.3.2. Características del semen en la especie canina

En el perro, el eyaculado se divide en tres fracciones bien diferenciadas entre sí, cuya eliminación ocurre progresivamente durante la eyaculación, si bien en animales muy entrenados es posible observar un periodo de latencia entre cada una de las fracciones. Las características de estas tres fracciones son las siguientes:

a) Primera fracción, preespermática o uretral: se elimina de forma muy rápida, oscilando el tiempo entre 30 segundos y 1 minuto. Presenta un aspecto acuoso y transparente, debido a la ausencia de espermatozoides o a su escaso número. En otras especies, es sabido que esta fracción procede de las glándulas de Littré que se localizan en la mucosa uretral; sin embargo, la especie canina no presenta estas glándulas por lo que, se deduce que, al igual que la tercera fracción, esta primera procede de la actividad secretora de la próstata. Su función principal se considera que es la eliminación de orina residual y la posible contaminación presente en la uretra (Allen, 1992; Peña, 1997).

b) Segunda fracción o espermática: su tiempo de emisión oscila entre 1-2 minutos, siendo la fracción rica en espermatozoides. Su aspecto es más o menos denso y su color oscila de blanco

lechoso a blanco opalescente en función de la concentración. La procedencia es del epidídimo (Peña, 1997) y de los conductos deferentes (Allen, 1992).

c) Tercera fracción o prostática: su eliminación se prolonga en el tiempo entre 3-30 minutos. El aspecto que presenta es acuoso, transparente o ligeramente amarillento y no contiene espermatozoides o están presentes en un bajo número. Como su nombre indica, procede de la próstata y se considera que facilita la ascensión de los espermatozoides en su camino al útero (Arthur, 1991; Allen, 1992; Peña, 1997; Threlfall, 2005).

En general, los valores totales de un eyaculado normal en perro (valores medios) serían de un volumen entre 4-25 ml, una osmolaridad de 320mOsm y un pH de 6.5-6.6 (Peña, 1997).

4.3.2.1. Características macroscópicas

1. Color

Un semen de buena calidad presenta un color blanco lechoso. Si se observara un color amarillento denotaría la presencia de orina, mientras que si es rojo o marrón sería indicativo de presencia de sangre fresca o hemolizada (Burke, 1986).

Este parámetro se evalúa mediante la observación directa del semen en el tubo graduado (vidrio o plástico) utilizado para la recogida (Peña, 1997; Kutzler, 2005a; Threlfall, 2005).

2. Volumen

Al igual que el parámetro anterior, el volumen del eyaculado se valora mediante observación directa en el tubo colector

graduado (Burke, 1986; Allen, 1992; Farstad, 2000b; Igueroada, 2001).

Los valores medios para un perro de raza mediana serían de 1-2 ml para la primera fracción, la segunda presentaría de 1-2 ml y finalmente unos 4-8 ml para la tercera (Burke, 1986). Sin embargo, lo más frecuente es que en función de la raza y el perro, se obtengan volúmenes de 0.1-2 ml de primera fracción, 0.2-4 ml para la segunda y 1-30 ml de tercera fracción (Igueroada, 2001; Threlfall, 2005).

4.3.2.2. Características microscópicas

I. Concentración

Habitualmente el modo de valoración de la concentración espermática se basa en realizar una dilución de la muestra de semen con solución salina formolada (Silva y Versteegen, 1995). Para la determinación de la concentración, se toma una muestra de esta dilución y se coloca en un hemocitómetro o cámara de Thoma-Neubauer, para finalmente observarse en un microscopio óptico a 40x (Rijsselaere et al., 2002; Threlfall, 2005). El número total de espermatozoides se calcula en función de la concentración y el volumen (Allen, 1992; Farstad, 2000a).

Otro procedimiento para determinar la concentración espermática, es valorar la opacidad mostrada por una muestra de semen diluido en solución salina formolada o solución isotónica de citrato, mediante un espectrofotómetro previamente calibrado; otros procedimientos técnicos (Spermacue®, Minitüb, Alemania) no requieren diluir el semen, sino que directamente se puede determinar la concentración espermática, a partir de una gota de semen, lo único que se requiere es calibrar el aparato en función de la especie animal

a la que se pretenda medir este parámetro (Rota et al., 1999a, b; Peña y Linde-Fosberg, 2000a, b; Peña et al., 2003).

En el perro hay descritos valores de concentración que oscilan entre $300-2000 \times 10^6$ espermatozoides/ml (esp/ml), considerándose normal para un perro de tamaño mediano 300×10^6 esp/ml (Burke, 1986). Sin embargo, otros autores describen concentraciones que varían entre 200 a más de 2000×10^6 esp/ml. Se considera que la concentración mínima aceptable que debe presentar un semen para utilizarse en una inseminación en fresco sería de 100×10^6 esp/ml (Farstad, 2000a; Iguer-ouada, 2001; Threlfall, 2005).

La observación de una baja concentración espermática puede deberse a una eyaculación incompleta generada frecuentemente por nerviosismo en machos jóvenes e inexpertos (Allen, 1992). También se puede observar este descenso en la concentración espermática en aquellos individuos tratados con esteroides anabolizantes u otros andrógenos; esta situación suele tener carácter transitorio, volviendo el eyaculado a la normalidad 2 meses tras la supresión del tratamiento (Allen, 1992). Asimismo, se debe tener en cuenta que valores bajos de concentración se deben en muchas ocasiones a que se recoge un excesivo volumen de fluido prostático que enmascara el verdadero número de espermatozoides presentes en la muestra seminal (Peña, 2004). Además, también es posible observar una disminución de la concentración cuando la eyaculación es incompleta (Peña, 2004).

Es posible también que se presente una baja concentración espermática en aquellos individuos que hayan desarrollado una

aplasia del epidídimo y/o de los conductos deferentes (Batista et al., 1998) o que algunas estructuras testiculares se hayan fibrosado como consecuencia de traumatismos o infecciones (Allen, 1992; Keenan, 2000). Cualquier tipo de alteración a nivel escrotal (dermatitis, heridas, infecciones) también genera un descenso de la concentración del eyaculado así como la presencia de inflamaciones como orquitis o epididimitos (Burke, 1986; Keenan, 2000). Otras posibles causas son la presencia de anomalías testiculares como la criptorquidia unilateral, tumores de células de Sertoli, seminomas, tumor de células intersticiales, degeneración testicular, etc. (Allen, 1992).

II. Motilidad

El método tradicional para determinar la motilidad espermática consiste en utilizar una gota de semen que se deposita entre un porta y un cubre para evaluar el movimiento de los espermatozoides, generando así una película fina que permita determinar de forma más o menos precisa el número de células móviles presentes en la muestra, e incluso realizar una valoración de si el tipo de movimiento observado es normal o no. Se observan varios campos por muestra utilizando para ello un microscopio óptico con contraste de fases a 200-400 aumentos.

Como todo el material debe encontrarse a temperatura de 37-39° C, se debe disponer de una placa térmica y el microscopio debe poseer una platina calentadora o una cámara con bulbos de luz incandescente (Peña, 1997; Peña, 2004; Threlfall, 2005). En muestras muy concentradas es recomendable realizar una dilución del semen en suero salino o un tampón de TRIS-fructosa (Rigau et al., 2001). La motilidad puede verse alterada

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

Actualmente, cada vez más autores están utilizando el sistema CASA (Computerized Assisted Sperm Analysis) para obtener un valor preciso y objetivo de la motilidad espermática y de la calidad del movimiento de los espermatozoides presentes en la muestra (Peña y Linde-Forsberg, 2000a; Rigau et al., 2001).

Este sistema ha provisto de interesantes resultados sobre los porcentajes medios de motilidad y las diferentes subpoblaciones de espermatozoides que coexisten en una misma muestra. Esta técnica es posible utilizarla tanto en semen fresco como en el congelado, refrigerado o capacitado (Peña, 2004) y también determina la concentración espermática. No obstante, presenta una serie de inconvenientes debido a que es necesario diluir las muestras hasta obtener concentraciones de 50-100 x 10⁶ esp/ml y no permite realizar una distinción entre espermatozoides y las partículas de yema de huevo de los diluyentes (Rijsselaere et al., 2003).

Asimismo, es necesario realizar estudios más concienzudos y establecer comparaciones entre laboratorios (Verstegen et al., 2002; Rijsselaere et al., 2003).

El valor normal de la motilidad del semen fresco en la especie canina oscila entre 85-95%.

Se considera que un valor por debajo del 80% de motilidad en semen fresco sería indicativo de una reducción de la fertilidad (Threlfall, 2005). No obstante, la mayoría de los autores considera que un semen presenta una buena motilidad cuando presenta valores entre 70-90% (Burke, 1986; Allen, 1992).

III. Viabilidad

El procedimiento más habitualmente utilizado para la valoración de la vitalidad lo representan las técnicas de tinción vital que permiten diferenciar los espermatozoides vivos de los muertos debido a la permeabilidad de la membrana plasmática a los colorantes vitales; por lo tanto, aquellas células que presentan una membrana plasmática funcional no permiten el paso del colorante, mientras que si está alterada el colorante penetra en el interior de la célula y aparece teñida (Farstad, 2000a; Peña, 2004).

El método más tradicional es la tinción con eosina-nigrosina, que también se utiliza para la valoración de las morfoanomalías; pero algunos autores describen el uso de otras tinciones como la eosina-azul anilina, trypan blue o el hypo-osmotic swelling test -HOST- (Rodríguez-Gil et al., 1994; Peña, 2004).

En el caso concreto del HOST, algunos autores han encontrado una correlación entre motilidad y vitalidad espermáticas, pero no existe correlación entre la motilidad, vitalidad y las morfoanomalías (Rodríguez-Gil et al., 1994). No obstante, no se ha podido establecer fehacientemente una relación entre el HOST y la fertilidad en el perro (Peña, 2004).

El procedimiento muestra una extensión donde aparecen células vivas de color blanco sobre un fondo púrpura, o teñidas de rosa si están muertas (Iguer-ouada y Verstegen, 2001). El mayor inconveniente que presenta el uso de la eosina-nigrosina es que, al ser un colorante hipotónico que se añade a una muestra que no ha sido fijada químicamente, puede producir morfologías anormales en los espermatozoides,

especialmente defectos en la cola (Peña, 2004). La extensión se valora en un microscopio provisto de contrastes de fases a 100-400 aumentos, y se deben contar un mínimo de 200 células y, a partir de ahí, extrapolar el porcentaje de células vivas (Alamo et al., 2005; Batista et al., 2006). En la mayoría de los trabajos, se considera que un semen es de muy buena calidad cuando se observa un 90-95% de espermatozoides vivos en fresco (Silva y Verstegen, 1995). En cuanto al semen congelado, el valor mínimo aceptable de vitalidad es del 80% (Silva et al., 1996).

IV. Morfología

Como se ha señalado previamente, la tinción habitualmente utilizada para valorar la morfología de los espermatozoides es la de eosina-nigrosina. La realización de esta técnica puede afectar a la morfología, por lo que las extensiones no deben realizarse de forma brusca para evitar roturas en las cabezas y colas, así como provocar la aparición de posturas anormales de los espermatozoides que enmascaran el resultado real, generando un número anormalmente alto de morfoanomalías. Además hay que asegurar que la muestra no ha sufrido ninguna modificación tras la recolección (Burke, 1986; Allen, 1992).

Otras causas que pueden provocar la aparición de morfoanomalías son el estrés asociado a inflamaciones localizadas a nivel genital, hipertermia, infecciones del tracto reproductivo, disminución de la secreción de LH y testosterona o alteraciones iatrogénicas (Paramo et al., 1993). Es frecuente el uso combinado de tinciones para valorar la vitalidad, con colorantes que permitan diferenciar el estado del acrosoma, como por ejemplo el uso combinado de Trypan blue y Giemsa o

Trypan blue, Bismarck brown y Rosa de Bengala, consiguiendo así valorar tanto la vitalidad, como las morfoanomalías y las acrosomías (Peña, 2004).

4.4. CONSERVACIÓN DEL SEMEN CANINO

4.4.1. Semen Conservado.

En la especie canina, el semen obtenido tras estimulación manual se suele conservar en tubos calibrados de plástico o cristal hasta el momento de su utilización. Si la muestra se mantiene en un baño María a 37 °C, el semen fresco puede mantener su viabilidad hasta 24 horas tras la recogida. En el caso de que se suplemente con un diluyente a base de yema de huevo o leche homogeneizada a la que se le ha eliminado el albumen, junto con antibióticos, puede aumentar su vida media hasta 4-5 días siempre que se conserve a 37 °C (Arthur, 1991; Farstad, 2000b; Kutzler, 2005a). Si no es posible mantener la muestra atemperada, otros autores recomiendan que se deberá utilizar en un plazo máximo de 15 minutos, para evitar que se enfríe con demasiada rapidez, ya que se produce un detrimento importante de su calidad (Allen, 1992).

4.4.2. Semen refrigerado

Para mantener el semen en refrigeración hay que añadir al medio de dilución un componente que proteja a los espermatozoides del shock frío, observándose que los mejores resultados se obtienen con la yema de huevo. Generalmente, se almacena el semen en tubos calibrados de cristal o plástico, aunque en ocasiones se utilizan envases menos convencionales como frascos calibrados de cristal o plástico (Rota et al., 1999a; Iguer-ouada, 2001; Iguer-ouada y Verstegen, 2001). La reactivación y prolongación de los

parámetros de motilidad parece ser que se ve influenciada por la suplementación de glucosa, la adición de yema de huevo fresco y la eliminación de productos de degradación presentes en el medio (Verstegen et al., 2005a). En cuanto a la glucosa, se ha observado que el aumento de este componente en el medio se encuentra relacionado con el porcentaje de espermatozoides estáticos. Asimismo, se ha comprobado que la baja motilidad espermática puede ser reactivada mediante la suplementación in vitro o in vivo de secreciones vagino-útero-oviductales (Verstegen et al., 2005a)

En diversos estudios realizados en la especie canina se ha demostrado que añadiendo a la muestra de semen un diluyente a base de yema de huevo es posible mantener la viabilidad hasta 10 días a 4 °C, sin alterar su viabilidad. Aunque se desconoce exactamente cuál es el mecanismo de reactivación de la yema de huevo, se sabe que el sustrato energético de los espermatozoides lo aporta la adición de fosfolípidos y, probablemente, la yema de huevo se encuentre involucrada en la producción de estos cambios (Iguer-ouada y Verstegen, 2001). No obstante, también existen otros trabajos donde se afirma que la viabilidad del semen de perro refrigerado es de 4-5 días como máximo (Allen, 1992; England, 1999).

4.5. Dilución de eyaculados

I. Composición de los diluyentes

El semen de cada especie tiene unas características especiales que impide que se desarrolle un diluyente universal. A pesar de esto, el diluyente debe reunir una serie de componentes que impida el deterioro de la muestra de semen y que básicamente son los siguientes:

- Agua bidestilada o ultrapura, como disolvente para el resto de componentes.
- Sustancias iónicas y no iónicas que aseguren el mantenimiento de la osmolaridad y pH del medio. En el semen canino, las más usadas son: citrato sódico, leche desnatada en polvo, leche desnatada uperizada, lactosa, ácido cítrico, TRIS (tris hidroximetil aminometano), TES (N-TRIS hidroximetil-2-aminometano ácido sulfónico), PIPES (piperazina etano ácido sulfónico) e hidróxido potásico (Badinand, 1990).
- Sustancias orgánicas que prevengan o amortigüen el shock frío, como la yema de huevo o leche (Foote, 1962; Jones, 1969).
- Agentes crioprotectores que garanticen la integridad celular ante los cambios de estado del agua principalmente. Presentan un doble mecanismo de acción; por un lado, disminuyen el punto crioscópico intracelular, con lo que disminuyen la concentración intracelular de solutos a bajas temperaturas al aumentar la cantidad de agua que permanece en estado líquido (Meryman, 1971) amortiguando así la toxicidad del medio (Cabrera, 1999) y, por otro lado, provocan la deshidratación celular mediante mecanismos de ósmosis que disminuye la formación de cristales de hielo intracelular (Watson, 1990) y extracelular durante la congelación, evitando poner en peligro la integridad de las membranas celulares (Cabrera, 1999). Los mejores resultados se

han obtenido con el DMSO (dimetilsulfóxido) y el glicerol (Salamon, 1968). La concentración final de glicerol para la criopreservación del semen canino oscila entre 3-8% (Hewitt et al., 2001). Si se añade únicamente DMSO no se observa una marcada mejoría con respecto a los resultados obtenidos con el glicerol (Olar, 1984).

- Azúcares simples como fuente de energía para los espermatozoides, o bien di- o trisacáridos como crioprotectores adicionales (Watson, 1990).
- Aditivos, como enzimas (α y β -amilasa, β -glucuronidasa, catalasa), detergentes (SDS-dodecil sulfato sódico, STLS-trietanolamina laurel sulfato sódico), aminoácidos (alanina, prolina, glicina-betaína, glicina-betaína+prolina) y otros compuestos (cafeína, prostaglandinas) que pueden mejorar la fertilidad (Foote y Arriola, 1987).
- Antibióticos, para evitar el crecimiento bacteriano (Watson, 1990).

2.1.8. ANTECEDENTES DE INVESTIGACIÓN

2.1.8.1. ANÁLISIS DE TESIS

Efecto De La Refrigeración Sobre La Motilidad, Integridad De Membrana Acrosomal Y Reacción Acrosomal En Espermatozoides Caninos

Manosalva, Iris P., Constanza Cortés, Leyva V., M. Valdivia C., M. De los Reyes S., C. Barros R. y R. Moreno (2005).

Métodos de preservación de espermatozoides mediante la refrigeración o el congelamiento han sido desarrollados para espermatozoides caninos; sin embargo, la tasa de fecundación artificial es baja, posiblemente por daños celulares aún no determinados. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la refrigeración sobre la motilidad, actividad mitocondrial, integridad de membrana acrosomal y reacción acrosomal en espermatozoides caninos incubados en tres medios distintos (Ferp Talp, CCMm, Sp Talp), utilizando nuevas metodologías (Mito Tracker, Lyso Tracker, SBTI). Los resultados indicaron una disminución significativa ($p < 0.05$) en la motilidad, viabilidad e integridad del acrosoma en espermatozoides refrigerados en comparación con los frescos; así como una dinámica de reacción diferente en espermatozoides refrigerados respecto a los frescos. Por otra parte, los medios Sp Talp y CCMm dieron mejores resultados en mantenimiento de la motilidad, actividad mitocondrial e integridad de membrana acrosomal.

Influencia en la Calidad Espermática de la Adición de Distintas Concentraciones de Crioprotectores para la Conservación del Semen Canino.

Martins, A. (2005).

El objetivo de este estudio fue valorar los efectos que sobre la motilidad, integridad de la membrana plasmática y acrosomal, grado de capacitación, reacción acrosómica y actividad mitocondrial, presenta la incorporación de distintos crioprotectores a los diluyentes de refrigeración y congelación del semen canino. Para este fin se realizaron 4 experimentos, en los que los espermatozoides preservados por refrigeración y congelación fueron analizados mediante métodos convencionales y, dependiendo del experimento, pruebas complementarias de valoración de la funcionalidad del espermatozoide, incluyéndose: -motilidad determinada mediante el sistema informático SCA®2002, -integridad de la membrana plasmática determinada por test de endósmosis o por tinción con el fluorocromo yoduro de propididum (PI) y tinciones de eosina, -integridad del acrosoma determinada mediante la tinción específica Spermac® o las lectinas fluorescentes de *Pisum sativum* (PSA) y de *Arachis hypogea* (PNA), -estado de capacitación con clortetraciclina (CTC), -actividad mitocondrial por tinción con Rodamina123 (R123) y -capacidad de experimentar reacción acrosómica mediante incubación con calcio ionóforo A23187 y lectinas fluorescentes. Los resultados obtenidos para cada variable se correlacionaron entre sí en cada experimento. Para ejecutar estos experimentos, se utilizaron pools de semen obtenidos a partir de la fracción espermática de distintos eyaculados provenientes de 19 perros entre los 2 y 7 años de edad, de distintas razas y

con fertilidad anterior probada. La selección de los eyaculados se realizó teniendo en cuenta una motilidad total superior al 80%, motilidad progresiva superior al 70% y el porcentaje de anomalías morfológicas inferior al 20%. En el experimento 1 se valoró la incorporación de aminoácidos al diluyente de refrigeración Tris-fructosa-ácido cítrico y 20% de yema (medio control) y se propuso la reducción de la concentración de yema. Los resultados sugieren que la suplementación con taurina a 30 y 50mM proporciona solo ligeras mejoras de la motilidad espermática y que la adición de 30mM de taurina ha permitido rebajar al 5% el porcentaje de yema, sin diferencias con el medio control hasta el día 7. Solamente se han observado diferencias entre los diluyentes que contienen un 20 y un 10% de yema, para la motilidad total estimada visualmente en los días 2 y 3 ($p < 0,001$). Se han obtenido altas y significativas correlaciones entre los resultados de motilidad estimada visualmente y mediante análisis informático, al igual que con el test de hipo-ósmosis (r entre 0,703 y 0,976, $p < 0,01$). El segundo experimento se realizó para valorar la capacidad del etilenglicol como crioprotector en el diluyente de congelación del espermatozoide canino, alternativamente o asociado al glicerol o la Pasta Equex®. La utilización de etilenglicol al 4% presenta resultados similares de motilidad a los obtenidos con 8% de glicerol; sin embargo, resulta perjudicial cuando se emplea al 8% ($p < 0,05$). La adición de Equex STM Paste® a un diluyente con 5% de etilenglicol mejora los resultados frente al 4% de etilenglicol o el 8% de glicerol ($p < 0,05$). El uso de 5% de etilenglicol y 0,5% de Equex-STM Paste no obtuvo mejores resultados que el diluyente Uppsala-Equex (con 5% de Glicerol y 0,5% de Equex-STM Paste), que permite mayor supervivencia celular post-descongelación. En el tercer

experimento se compararon los resultados de evaluación de la actividad mitocondrial espermática, realizada mediante citometría de flujo tras tinción con R123 asociada a PI, con los de valoración de la vitalidad por tinción con eosina-nigrosina y de la motilidad estimada subjetivamente; pudiéndose establecer altas correlaciones entre ellos (r de 0,992 a 0,999, $p < 0,01$). En el cuarto experimento se estudió el impacto de la suplementación del diluyente de congelación Uppsala-Equex con los aminoácidos taurina o hipotaurina a 0, 25, 50 y 75mM en distintos aspectos de las funciones espermáticas. No se obtuvo influencia significativa en la motilidad espermática; sin embargo, la adición de 25mM de hipotaurina presentó un valor significativamente menor del factor ALH tras 2h en incubación a 38°C ($p = 0,021$), mientras que la adición de 50mM de hipotaurina dio lugar a un mayor % de células espontáneamente reaccionadas (PI-PSA+) inmediatamente a la descongelación y tras 1h:30' en incubación a 38°C ($p < 0,001$).

2.1.8.2. ANÁLISIS DE TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN

Evaluación de dos diluyentes para la conservación de semen canino bajo condiciones de refrigeración: Efectos del tiempo de refrigeración, grado de dilución y de la concentración de fructosa.

Baquero, J., Pardo, E., y P. Cruz (2004).

El propósito de este trabajo fue evaluar la utilización de dos diluyentes para la conservación de semen canino bajo condiciones de refrigeración, estudiando los efectos del tiempo de almacenamiento, el grado de dilución y los niveles de fructosa, sobre la movilidad, morfología e integridad acrosomal.

Se utilizaron 5 machos adultos, sin raza definida (SRD), con edades entre 3 y 6 años, clínicamente sanos. Las muestras se obtuvieron mediante manipulación digital del pene, colectando únicamente la segunda fracción del eyaculado. Cada alícuota fue diluida en proporción 1:2., 1:4 ó 1:8 hasta un volumen total de 0,5 ml, empleando como diluyentes TRIS-ácido cítrico yema de huevo o TRIS - Citrato de Sodio - Yema de huevo, con 1,3 ó 1,6 g de fructosa. Inicialmente las muestras fueron enfriadas gradualmente hasta 4 °C (1 °C /4 min.) y luego almacenadas en una nevera convencional (4 ± 2 °C). La evaluación del semen fue realizada antes de la dilución y a las 6, 12, 24, 48, 72 y 96 h de almacenamiento, determinando % movilidad masal, % viabilidad espermática, anormalidades morfológicas e integridad acrosomal; ésta última se evaluó mediante microscopia de contraste de fase. La movilidad fue evaluada por observación directa al microscopio de una gota gruesa de semen y calificada en una escala de 1 a 4, siendo 4 el mayor grado de movilidad. A las seis horas de almacenamiento no se observó diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los diferentes tratamientos. Posteriormente, a medida que transcurrió el tiempo, la movilidad espermática disminuyó gradualmente, observándose los menores valores en el semen diluido en proporción 1:2; los efectos de la concentración de azúcar y del tipo de diluyente utilizado no fueron significantes. Por otra parte, los efectos del tiempo de almacenamiento sobre la morfología, viabilidad e integridad acrosomal, tampoco fueron significantes.

Comparación del Efecto de dos Diluyentes sobre la Fertilidad Potencial de Semen Canino Refrigerado.

Sánchez, A., Cartagena, A., y M. Berland (2006).

Con el propósito de evaluar el efecto de dos diluyentes seminales sobre la fertilidad potencial de espermatozoides caninos conservados a 4 °C, se obtuvieron 20 eyaculados mediante manipulación digital. Cada eyaculado fue evaluado a través de espermiograma y de la prueba hipoosmótica (HOST), para luego ser fraccionado y diluido en relación 1:3 con uno de los siguientes diluyentes: yema de huevo + TRIS (EYT) (365 mOsm/kg, pH 6.8) y leche descremada fluida UHT (LD) (272 mOsm/kg, pH 6.8). En el semen fresco, la motilidad progresiva (MP) fue $95.7 \pm 3.6\%$ y la respuesta a HOST de $79.8 \pm 6.6\%$. Para comparar el efecto del diluyente sobre la preservación de la fertilidad potencial, se realizaron evaluaciones de MP e integridad de membrana con HOST a las 24, 48, 72 y 96 horas de refrigeración del semen, observándose mayores valores de MP y de espermatozoides dilatados en el diluyente EYT en todos los tiempos ($p < 0.05$). No obstante, los valores de MP ($>70\%$) y HOST ($>60\%$) observados en cada uno de los tiempos de evaluación, independiente del tipo de diluyente, superaron los valores mínimos establecidos como adecuados para uso del semen canino refrigerado en inseminación artificial. En conclusión, el diluyente en base a leche descremada UHT, de fácil preparación y bajo costo, resulta una alternativa de uso en la clínica de pequeños animales.



III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. LOCALIZACIÓN DEL TRABAJO

La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio de Investigación I – 302 del Campus principal de la Universidad Católica de Santa María, ubicada en el Cercado de Arequipa, Provincia y Departamento del mismo nombre.

- **Altitud**

Se encuentra a una altitud de 2242 m.s.n.m (SENAMHI, 2005).

- **Temperatura promedio y precipitación pluvial**

Temperatura promedio de 15.8 °C con una variabilidad de 8.2 °C a 25.6 °C., con una humedad relativa mayor a 27 % y menor a 70% y una precipitación promedio de 78 mm (SENAMHI, 2005).

3.1.2. MATERIALES BIOLÓGICOS

- 5 caninos adultos sin raza definida (SRD), intradomiciliarios, clínicamente sanos y de fertilidad comprobada.

3.1.3. MATERIALES DE LABORATORIO

Reactivos

- Solución salina
- Solución fisiológica atemperada

- Leche UHT descremada.
- Dilutor Glucosa-citrato, composición:
 - Glucosa (37 mg/100ml)
 - Citrato de sodio (6 mg/100 ml)
 - EDTA (12,7 mg/100 ml)
 - Cloruro de potasio (7,5 mg/100 ml)
 - Sulfato de estreptomicina (50 mg/100 ml)
 - Penicilina benzatínica (50 mg/100ml)
 - Agua bidestilada (100 ml)
- Dilutor leche descremada UHT, composición:
 - Leche descremada fluida UHT (100 ml)
 - Sulfato de estreptomicina (50 mg/100 ml)
 - Penicilina benzatínica (50 mg/100ml)
 - Agua bidestilada
- Solución hiposmótica, composición:
 - Fructuosa (0.675 g/l)

- Citrato de sodio (0.268g/l)
- Agua corriente (1 l)

- Reactivos para viabilidad y morfología
 - Doble tinción de eosina-nigrosina
 - Solución salina formolada al 0.3%

3.1.4. MATERIALES DE CAMPO

- Mandil
- Computadora portátil
- Registros de animales muestreados

3.2. MÉTODOS

3.2.1. MUESTREO

Tamaño de la muestra

Procedimientos de muestreo

Las muestras seminales fueron obtenidas de acuerdo al protocolo establecido por Álamo (2007), el cual se describe a continuación:

- Previamente al inicio de cada una de las recogidas seminales, se realizó una inspección minuciosa de los genitales externos del macho para descartar posibles patologías. Posteriormente, se efectúa una limpieza del pene y prepucio con suero fisiológico atemperado, con objeto de eliminar los posibles restos de orina, exudados, pelos o suciedad que podrían generar una disminución de la calidad del eyaculado obtenido.
- La obtención de los eyaculados se realizó por estimulación manual y siempre fue realizada por el mismo operador. La estimulación manual se inició sobre el bulbo del pene, observando como aumentaba progresivamente de tamaño; luego se exteriorizó el bulbo fuera del prepucio. A continuación se realizó la rotación caudal de 180° del pene, intentando de esta forma simular al máximo la disposición anatómica que adquiere el pene cuando se produce una monta natural entre un macho y una hembra de la especie canina. En este punto, se continuó estimulando el bulbo hasta que alcanzó un tamaño adecuado para que se iniciara la eyaculación y, a partir de este momento, se comenzó a realizar una serie de pequeñas contracciones sobre el bulbo (similares a las que ocurren de forma fisiológica en la vagina de la hembra), para favorecer el inicio de la eyaculación.
- Al comenzar la eyaculación, se recogió de forma independiente la segunda fracción del eyaculado, desechando las primera y la tercera, puesto que para el posterior procesamiento del semen sólo se precisaba de la segunda fracción. Esta recogida se llevó a cabo en tubos de recolección graduados y atemperados a 37 °C; de esta forma, se desecharon en su totalidad la 1ª y 2ª fracción del eyaculado, mientras que de la 3ª fracción, habitualmente más voluminosa, ésta se recogió para valorar el volumen de eyaculado y analizar las variables independientes. Todos los tubos de recogida se colocaron lo más pronto

posible en un baño María a 37 °C para mantener las muestras atemperadas y evitar que los espermatozoides sufran algún deterioro en su calidad, que pudiese interferir negativamente en la posterior técnica de diluyo-conservación. Posteriormente se procedió a analizar dichas muestras

- La frecuencia de recogida fue semanal, hasta obtener las 4 dosis por donante

3.2.2. MÉTODOS DE EVALUACIÓN

a. Metodología de la experimentación

Parámetros Macroscópicos

I. Volumen eyaculado

El volumen del eyaculado se determinó por observación directa de los tubos colectores graduados utilizados para la colecta. Estos tubos de recogida se colocaron, inmediatamente tras la obtención del eyaculado, en un baño María a 37° C, manteniéndose atemperados durante todo el proceso de evaluación seminal (Álamo, 2007).

II. Color del eyaculado

El color el eyaculado se valoró directamente en el tubo colector de recogida, por observación directa del mismo y antes de los 5 minutos desde la recogida (Álamo, 2007).

Parámetros Microscópicos

I. Motilidad

Para evaluar el porcentaje de espermatozoides móviles se utilizó una gota de semen fresco sin diluir. Cuando la concentración espermática fue muy elevada, se diluyó la muestra en solución salina (0.9% NaCl) a 37 °C, En cualquier caso, se tomará una gota que se colocará entre un portaobjetos y un cubreobjetos atemperados a 37 °C), generando así una fina película que permitió determinar el número de células móviles presentes en la muestra. El semen se observó utilizando un microscopio óptico de 400 aumentos.

La valoración del movimiento se realizará sobre aquellos espermatozoides que muestren un movimiento progresivo. Sólo se consideraron los espermatozoides con movimientos de avance y no aquellos que presentaron movimientos rotatorios, movimientos circulares o movimientos vibratorios (Nöthling y Shuttleworth, 2005).

II. Concentración espermática

La determinación de la concentración seminal se realizó diluyendo previamente el semen a razón de 1:41 en una solución salina formulada al 0.3%; se diluirá 0.05 ml de semen en 2.0 ml de solución salina formulada; Luego se tomó una muestra de esta dilución y se llenó por capilaridad la cámara de Thoma - Neubauer, para finalmente observar en un microscopio óptico a 400 aumentos. El número de espermatozoides observados en una superficie de 0.2 mm^2 (80 cuadros pequeños de 0.0025 mm^2 cada uno y distribuidos en 5 cuadrados grandes), fue multiplicado por 2.050.000 para obtener la concentración en espermatozoides por mililitro, teniendo en cuenta la dilución realizada (1/41) y el volumen cubierto con el recuento ($0.2 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm de altura} = 0,02 \text{ mm}^3$).

III. Viabilidad espermática

El recuento de espermatozoides vivos se llevó a cabo individualmente en cada uno de los eyaculados recogidos (4 por animal), (Álamo, 2007). Este parámetro se evaluó utilizando la doble tinción de eosina-nigrosina (Barth y Oko, 1989), y se ejecutó de la siguiente manera, sobre un portaobjetos a 37 °C, se mezcla una gota de unos 4-5 mm de diámetro de dicho colorante (mantenido a su vez en un baño María a 37 °C), con otra de 5-6 mm de semen fresco sin diluir, y también mantenido en el baño María a 37 °C. Una vez mezcladas ambas gotas, se deslizará un portaobjetos, con un ángulo de 30-40°, sobre el primero para obtener una extensión que seque rápidamente al aire y se observó a 400 aumentos en un microscopio óptico.

Para la realización de esta valoración se consideró muertos a todos aquellos espermatozoides que presentaron algún indicio de coloración oscuro, indicativo de una alteración de la membrana citoplasmática, y vivos a todos los espermatozoides que muestren un color totalmente blanco, indicativo que presentan una membrana funcional que no permite el paso del colorante. Para obtener el correspondiente porcentaje se valoró un mínimo de 200 células espermáticas por muestra.

IV. Morfología

De acuerdo a Álamo (2007), para llevar a cabo la valoración de la morfología espermática, se evaluó un mínimo de 200 espermatozoides por muestra, utilizando la misma extensión de eosina-nigrosina que estaba preparada para la obtención del

porcentaje de viabilidad espermática. El porcentaje de espermatozoides con formas anormales se determinó mediante la valoración de las muestras en un microscopio entre 400 - 1000 aumentos y se cuantificó espermatozoides normales o con las siguientes alteraciones:

- Espermatozoides normales
- Espermatozoides con gota citoplasmática proximal
- Espermatozoides con gota citoplasmática distal
- Espermatozoides con colas enrolladas
- Espermatozoides con colas dobladas

V. Prueba de funcionalidad de la membrana plasmática del espermatozoide (prueba hiposmótica)

Esta prueba se realizó incubando 100 μL de semen en 900 μL de solución hiposmótica, previamente calentada a 38°C , en baño maría a la misma temperatura durante 45 minutos. Se analizó una alícuota de 5,5 μL en microscopio (400 aumentos), contando un total de 200 espermatozoides. Aquellos espermatozoides que presenten las colas hinchadas o enrolladas, fueron considerados espermatozoides con integridad de membrana intacta (Jeyendran et al., 1984).

VI. Procedimientos de dilución y conservación seminal

Se seleccionaron aquellas muestras de semen que presentaron, una motilidad y una viabilidad superior al 80%, y un porcentaje de morfología anormal menor al 20%, los eyaculados de cada uno de los

ejemplares fueron sometidos a los procedimientos de dilución y conservación que a continuación se describen.

- En primer lugar, la fracción espermática fue sometida a una centrifugación a 2200 rpm durante 6 minutos, para conseguir una mayor concentración de espermatozoides. El objetivo es asegurar la eliminación el pequeño volumen de primera y tercera fracción que hubiese podido mezclarse con la segunda fracción durante las recogidas, y concentrar la fracción espermática.
- Una vez retirado el sobrenadante mediante aspiración cuidadosa con pipetas Pasteur, el sedimento resultante se resuspendió mediante adición a temperatura ambiente con cada dilutor en una relación 1:2 (semen : dilutor).
- Posteriormente se dividieron 2 alícuotas de 0,5 ml en crioviales por cada dilutor, y se analizó cada uno de los parámetros detallados previamente, en cuatro diferentes momentos, hora cero, 24 horas, 36 horas y 48 horas desde la obtención del eyaculado.

b. Recopilación de la Información

En el campo:

- Entrevista y encuesta a los ganaderos.
- Registro de pesos recopilados en Granja para su posterior análisis.
- Observaciones anotadas.

En otros ambientes generadores de información científica.

- Libros relacionados al tema.
- Revistas científicas especializadas.
- Internet paginas Web relacionadas al tema.
- Intercambio de información con profesionales de campo.
- Eventos científicos nacionales e internacionales relacionados con el tema de investigación.

3.2.3. VARIABLE DE RESPUESTA

a) Variables independientes

- Dilutores

b) Variables dependientes

- Volumen (ml)
- Color (blanco lechoso, blanco opalescente, etc)
- Motilidad (%)
- Viabilidad (%)
- Morfología (% de cada categoría)
- Concentración (espermatozoides por ml)
- Integridad de membrana (%)

3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Distribución de tratamientos

Dos tratamientos con 5 repeticiones y 4 horas de evaluación.

Análisis de varianza

Para las variables dependientes que están expresadas en porcentaje se aplicó una transformación angular a seno del arco, de esta manera serán analizadas en un ANVA factorial 2 X 4 (dos tratamientos y cuatro horas de evaluación), se considerará una probabilidad del 95%

Para el caso de categorías (variable dependiente morfología) éstas fueron analizadas mediante la prueba de chi cuadrado y Fisher, a una probabilidad del 95%.

Análisis de significancia

Se utilizó la prueba de Duncan a una probabilidad del 95% (0,05).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

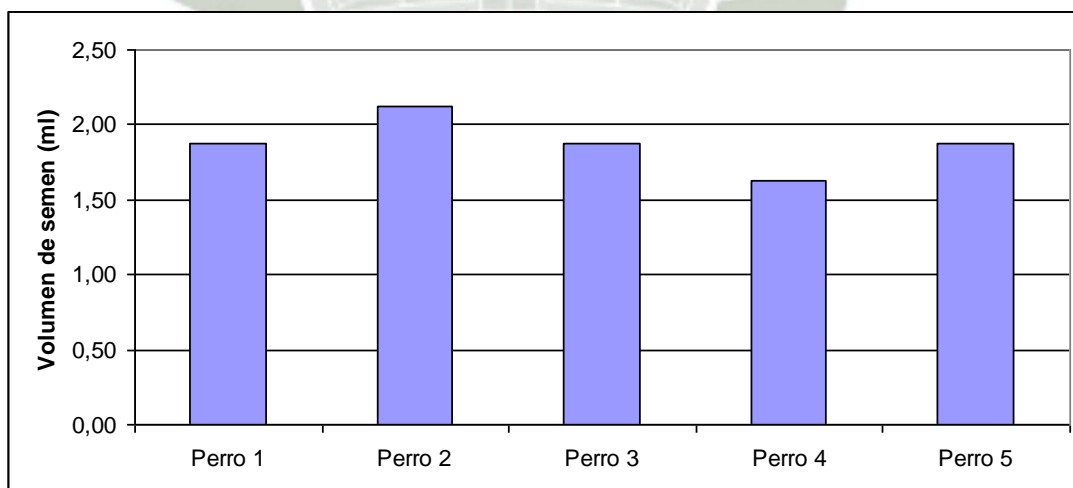
4.1. Volumen (ml).

Cuadro Nº 1

Animal	Perro 1	Perro 2	Perro 3	Perro 4	Perro 5	Promedio
Promedio	1,88 ^a	2,13 ^a	1,88 ^a	1,63 ^a	1,88 ^a	1,88
DS	0,25	0,25	0,48	0,25	0,25	0,30

Promedios con letras diferentes como superíndice en la misma fila, denotan diferencia estadística significativa (Duncan $P < 0.05$)

Gráfico Nº 1



En el cuadro y gráfico Nº 1 se muestran los volúmenes de obtención de semen canino, correspondientes a la fracción rica en espermatozoides

(segunda fracción), desechando las anteriores, considerando que la fracción 1 y 3 contienen condiciones que afectan la movilidad y conservación del semen canino (Rota et al., 1995), luego de analizar el volumen obtenido estadísticamente, se ha observado que no existe diferencia estadística significativa ($P > 0.05$) entre cada uno de los animales en estudio; asimismo, el valor promedio final observado fue de $1,88 \pm 0,30$ ml, este valor es similar al volumen reportado para perros de tamaño mediano; al respecto, Sánchez et al. (2006) encontraron un valor de $1,70 \pm 0,5$ ml.



4.2. Color

Cuadro N° 2

Animal	Perro 1	Perro 2	Perro 3	Perro 4	Perro 5
Muestra 1	BL	BL	BO	BL	BL
Muestra 2	BL	BL	BO	BL	BL
Muestra 3	BL	BL	BL	BL	BL
Muestra 4	BL	BL	BL	BL	BL

BL: Blanco lechoso

BO: Blanco opalescente

El Cuadro N° 2 muestra la categorización del color en el semen obtenido en perros bajo condiciones de la presente investigación, como se observa el color blanco lechoso, es el predominante por lo cual no fue necesario aplicar un diseño estadístico en particular. El color en el análisis del semen en caninos, es una prueba subjetiva que indirectamente puede indicar la concentración de células espermáticas; por lo cual el color hallado (blanco lechoso) es el color deseable en caninos; asimismo, el color hallado en forma subjetiva en las muestras de semen en la presente investigación, son consistentes a investigaciones previas (Álamo, 2007).

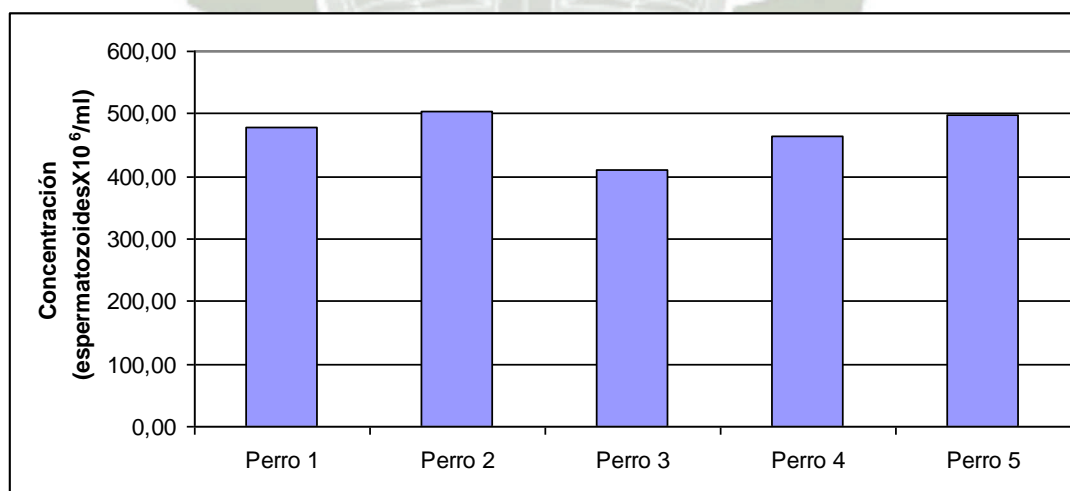
4.3. Concentración (espermatozoides por 1000/ml)

Cuadro Nº 3

Animal	Perro 1	Perro 2	Perro 3	Perro 4	Perro 5	Promedio
Promedio	477,65 ^{ab}	502,76 ^a	408,98 ^b	463,81 ^{ab}	499,18 ^a	470,48
DS	90,65	63,81	20,26	30,70	34,24	47,93

Promedios con letras diferentes como superíndice en la misma fila, denotan diferencia estadística significativa (Duncan $P < 0.05$)

Gráfico Nº 3



El cuadro y gráfico N° 4 presentan los valores de concentración espermática por ml. Se encontraron que los mayores valores se observaron en el perro N° 2 y 5 ($502,76 \times 10^6$ y $499,18 \times 10^6$, respectivamente) luego en el perro N° 1 y 4, con valores de $477,65 \times 10^6$ y $463,81 \times 10^6$ espermatozoides por ml, por el contrario en el perro N° 3 se observaron los valores más bajos, el cual presenta diferencias estadísticas con el perro N° 2 y 5 ($P < 0,05$); sin embargo, todos los valores observados en esta investigación se hallan dentro de los rangos reportados por investigaciones precedentes.

En el perro hay descritos valores de concentración que oscilan entre $300 - 2000 \times 10^6$ espermatozoides/ml (esp/ml), considerándose normal para un perro de tamaño mediano 300×10^6 esp/ml (Burke, 1986; Concannon, 1993). Sin embargo, otros autores describen concentraciones que varían entre 200 a más de 2000×10^6 esp/ml. Se considera que la concentración mínima aceptable que debe presentar un semen para utilizarse en una inseminación en fresco sería de 100×10^6 esp/ml (Farstad, 2000a; Iguer-ouada, 2001). De otro lado, England y Allen (1989) refieren en un estudio realizado en 28 perros fértiles una concentración media de $299,6 \pm 127,9$ millones de espermatozoides por mililitro, mientras que Farstad (1998b) refiere valores entre 100-700 millones/ml, este último valor presenta un rango similar al encontrado en esta investigación.

4.4. Motilidad (%).

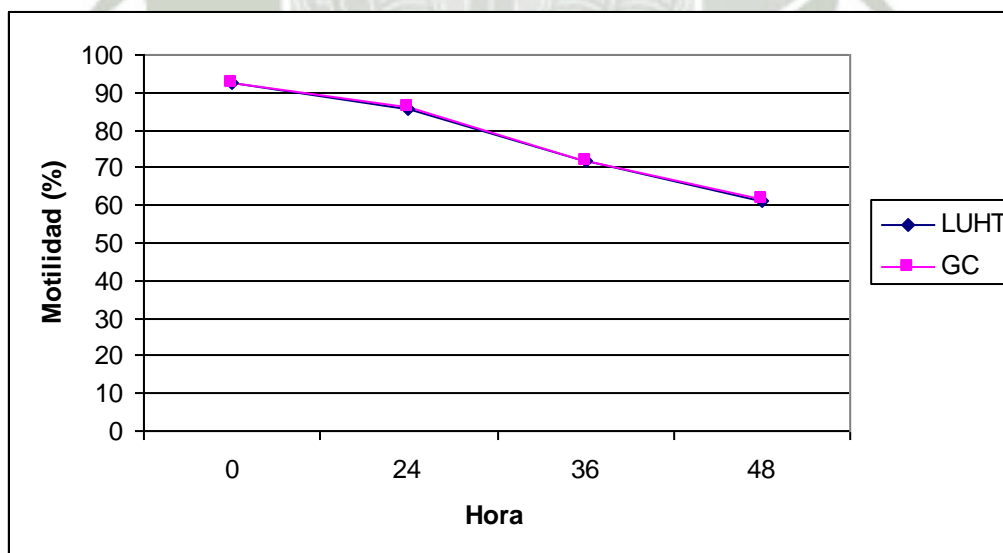
Cuadro N° 4

Dilutor	Horas			
	0	24	36	48
LUHT	92,40 ^a	85,90 ^b	71,60 ^c	61,10 ^d
GC	92,40 ^a	86,05 ^b	71,85 ^c	61,95 ^d

Promedios con letras diferentes como superíndice en la misma fila y columna, denotan diferencia estadística significativa (Duncan $P < 0.05$).

LUHT: Dilutor base leche UHT
GC: Dilutor base glucosa citrato

Gráfico N° 4



En el Cuadro N° 4 y Gráfico N° 4, se presentan los valores de motilidad espermática, en este caso por efecto de los dilutores y en las 4 horas de evaluación; observamos un valor inicial de 92,40% en el tratamiento en base al dilutor Leche UHT, y 92,7 % en el caso del tratamiento en base al dilutor glucosa citrato, estos valores fueron similares estadísticamente ($P > 0,05$).

Los valores iniciales de motilidad antes de la dilución son similares a los encontrados por otras investigaciones en semen de caninos y utilizando también leche como dilutor, y otro dilutor en base a yema de huevo; al respecto, Sánchez et al. (2006) encontraron porcentajes de motilidad de 95,7%, los cuales son similares a los hallados en la presente investigación.

Al igual que otras investigaciones, considerando las las horas de evaluación, se puede apreciar una tendencia lineal en la disminución de la motilidad progresiva en el semen refrigerado, lo cual concuerda con lo observado en estudios de refrigeración de semen con distintos diluyentes en caninos (Goodman y Cain, 1993; Iguer-Ouada y Verstegen, 2001), el mismo comportamiento ha sido observado en otras especies, como ovinos (Watson, 1981), equinos (Sánchez et al., 1995) y felinos (Sánchez y Tsutsui, 2002). Estas observaciones podrían explicarse por un efecto acumulativo del shock hipotérmico sobre las células espermáticas a través del tiempo (Batellier et al., 2001). Respecto a la comparación entre dilutores en los diferentes tiempos de evaluación, no se hallaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre ellos; sin embargo, cabe destacar que la motilidad alcanzó valores sobre 60% hasta las 48 horas; valores que pueden ser considerados como adecuados en cuanto a las exigencias para uso de semen canino en inseminación artificial (Linde-Forsberg, 2001). Estos hallazgos se deberían al efecto de la refrigeración sobre los espermatozoides caninos en el cual se ve reflejada una disminución de la motilidad e integridad de membrana y actividad mitocondrial y en el aumento de la reacción acrosomal, el mecanismo por el cual disminuye la motilidad no ha sido elucidado por

completo; sin embargo, se sabe que la motilidad espermática es particularmente dependiente de la función mitocondrial (Kao et al., 1998).

4.5. Viabilidad (%).

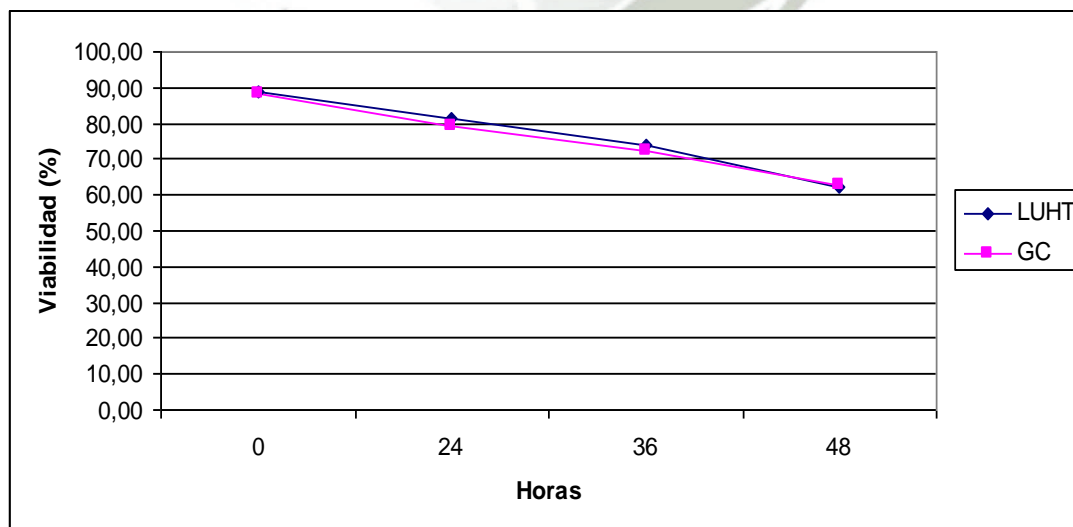
Cuadro Nº 5

Dilutor	Horas			
	0	24	36	48
LUHT	88,65 ^a	81,15 ^b	73,90 ^c	62,30 ^d
GC	88,65 ^a	79,50 ^b	72,20 ^c	63,00 ^d

Promedios con letras diferentes como superíndice en la misma fila y columna, denotan diferencia estadística significativa (Duncan $P < 0.05$).

LUHT: Dilutor base leche UHT
GC: Dilutor base glucosa citrato

Gráfico Nº 5



El efecto de la adición de los dos dilutores sobre el semen canino afectó significativamente ($P < 0.05$) la viabilidad de los espermatozoides en el tiempo, este comportamiento se debería al igual que en el caso de la motilidad, a los efectos de la refrigeración la cual afectaría principalmente la membrana acrosomal, lo cual ocasionaría la disminución tanto de la motilidad como de la viabilidad espermática. En otros estudios bajo condiciones similares, y utilizando leche descremada como dilutor base, se hallaron valores mayores de integridad mitocondrial que de motilidad, lo cual podría sugerir que la muerte celular se realiza por apoptosis (Dinsdate et al., 1998; Green y Reed, 1998). Otros autores han señalado que este estado mitocondrial podría ser debido a alteraciones en el metabolismo de energía sin daño de integridad de membrana (Vetter et al., 1998); sin embargo, los resultados del presente estudio permiten generalizar que el efecto de la refrigeración se produciría por alteraciones a nivel de integridad de membrana mitocondrial debido a la disminución de la integridad de membrana acrosomal, lo cual conduciría a una disminución de la viabilidad.

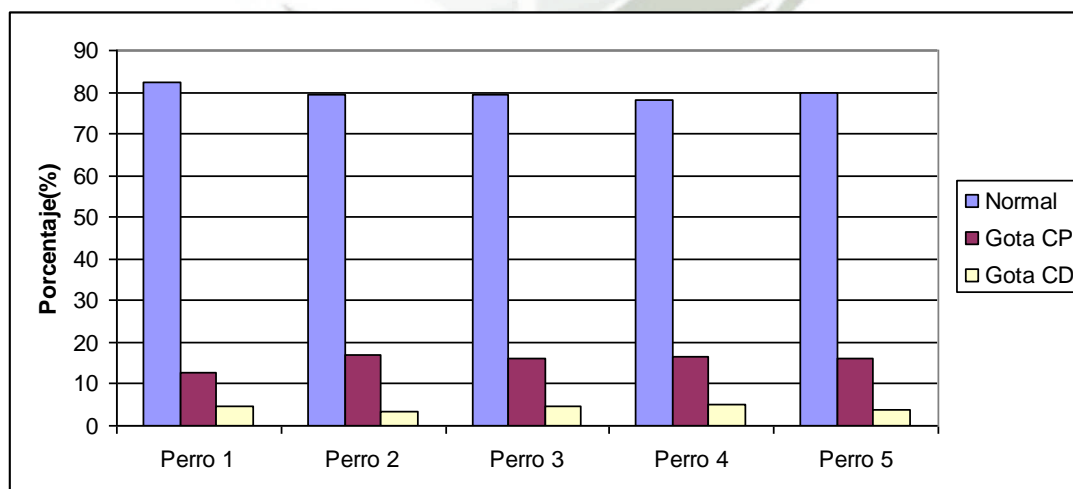
4.6. Morfología espermática (% de cada categoría)

Cuadro Nº 6

Morfología	Perro 1	Perro 2	Perro 3	Perro 4	Perro 5	Promedio
Normales	82,50 ^a	79,50 ^a	79,50 ^a	78,25 ^a	80,00 ^a	79,95
Gota CP	12,75 ^b	17,00 ^b	16,00 ^b	16,50 ^b	16,25 ^b	15,7
Gota CD	4,75 ^c	3,50 ^c	4,50 ^c	5,25 ^c	3,75 ^c	4,35

Fuente: Elaboración personal

Gráfico Nº 6



El cuadro y gráfico N° 6 muestran los valores del porcentaje de morfología normal y anomalías halladas en los 5 perros bajo estudio. Observamos que el porcentaje promedio de espermatozoides normales fue de 80% el cual debería ser considerado como normal, considerando que este valor representa el porcentaje mínimo de espermatozoides normales para iniciar los procedimientos de refrigeración (Baquero et al., 2004).

Al respecto de nuestros resultados las principales anomalías observadas en espermatozoides de perro corresponden a alteraciones en la pieza intermedia. Otros autores mencionan que en la pieza intermedia se han encontrado gotas proximales y distales así como piezas intermedias torcidas y en la cola se observaron colas torcidas y enrolladas a nivel de la pieza intermedia (Kustriz et al., 1998). En un estudio realizado por Morton y Bruce (1989) sobre 167 perros fértiles el porcentaje de células normales fue de 69,1%, y en la pieza intermedia se halló el principal porcentaje de anomalías (13,4 %) Estos autores destacan que algunos defectos morfológicos, como es el caso de persistencia de gota proximal en el tracto intermedio, están asociados a porcentajes de concepción más reducidos. El motivo por el cual los espermatozoides con gota proximal no se conservan bien podría estar relacionado con el contenido de las gotas en enzimas lisosomales, así, tras la congelación y la descongelación sufren destrucción de su membrana, causando liberación de las enzimas hidrolíticas y rompiendo la membrana del espermatozoide y, en consecuencia, afectando severamente su motilidad. Este defecto origina una motilidad post-descongelación inferior a la aceptable del 50%, mientras algunas anomalías en el cuello como fractura y, en piezas intermedias y colas como las dobladas o las enrolladas cursan con motilidades prácticamente nulas (Morton y Bruce, 1989). Estas condiciones también se estarían presentando bajo condiciones de la presente investigación

4.7. Integridad de membrana (%)

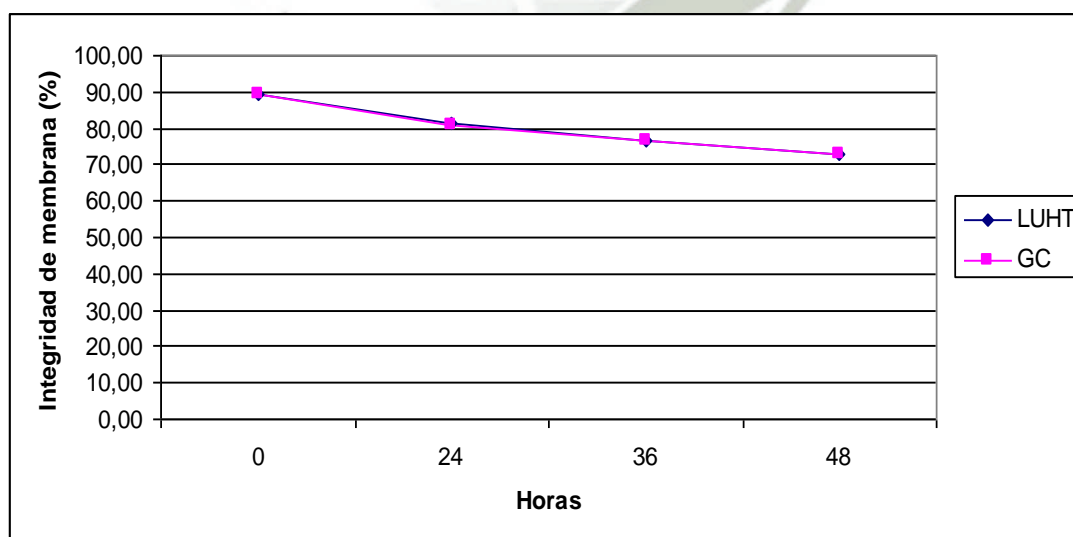
Cuadro Nº 7

Dilutor	Horas			
	0	24	36	48
LUHT	89,55 ^a	81,40 ^b	76,70 ^c	73,00 ^d
GC	89,55 ^a	80,70 ^b	76,40 ^c	73,05 ^d

Promedios con letras diferentes como superíndice en la misma fila y columna, denotan diferencia estadística significativa (Duncan $P < 0.05$).

LUHT: Dilutor base leche UHT
GC: Dilutor base glucosa citrato

Gráfico Nº 7



El cuadro y gráfico N° 7 representan los porcentajes de integridad de membrana en espermatozoides sometidos a los dos dilutores y al efecto de cuatro horas de evaluación, no se han encontrado efectos originados por el dilutor; sin embargo, durante las horas de evaluación se observa una disminución lineal en el tiempo, estos valores si difieren significativamente ($P < 0.05$), lo cual permite establecer que conforme pasa el tiempo, la integridad de membrana se altera significativamente.

Estos resultados podrían ser explicados por una desestabilización a nivel de la membrana, producto del refrigeramiento, en donde la composición lipídica de la bicapa se ve afectada por la tasa de refrigeración. Este proceso ha sido determinado previamente en espermatozoides de ovino a temperatura inferior de 15 °C (Maxwell y Jonson, 1999).

Asimismo, Durante el choque por frío, los fosfolípidos interactúan con la estructura lipídica de la membrana plasmática de las células espermáticas y proveen protección. Las lipoproteínas se unen a la membrana de la célula espermática y ayudan a conservar la integridad celular durante el almacenamiento (Bouchard et al., 1990). La estabilidad de la membrana y la resistencia al choque por frío está relacionada con el contenido de fosfolípidos de la membrana celular. Una baja proporción de fosfolípidos poliinsaturados - ácidos grasos saturados en la composición espermática, ha sido relacionada con una alta resistencia al choque por frío (Bouchard et al., 1990). La fluidez de la membrana se habría aletrado por la temperatura, al descender ésta se produce un reacomodo de las cadenas de fosfolípidos en forma de paquetes, ya sea en forma bilaminar o hexagonal, formándose con esto regiones cristalinas. De otro lado, también se ha mencionado que al descender la temperatura, disminuye la formación de ATP, por lo que la bomba sodio-potasio de la membrana plasmática (ATP dependiente) también disminuye su actividad. Esto causa que el potasio que atraviesa la membrana para salir, fluya a una tasa mayor que el potasio que entra, por lo

que la concentración de potasio intracelular disminuye, y la relación sodio-potasio se altera. Esto causa una despolarización de la membrana, abriéndose por ello los canales de calcio, el cual activa enzimas fosfolipasas, ocasionando una alteración general de las membranas (Baquero et al., 2004).

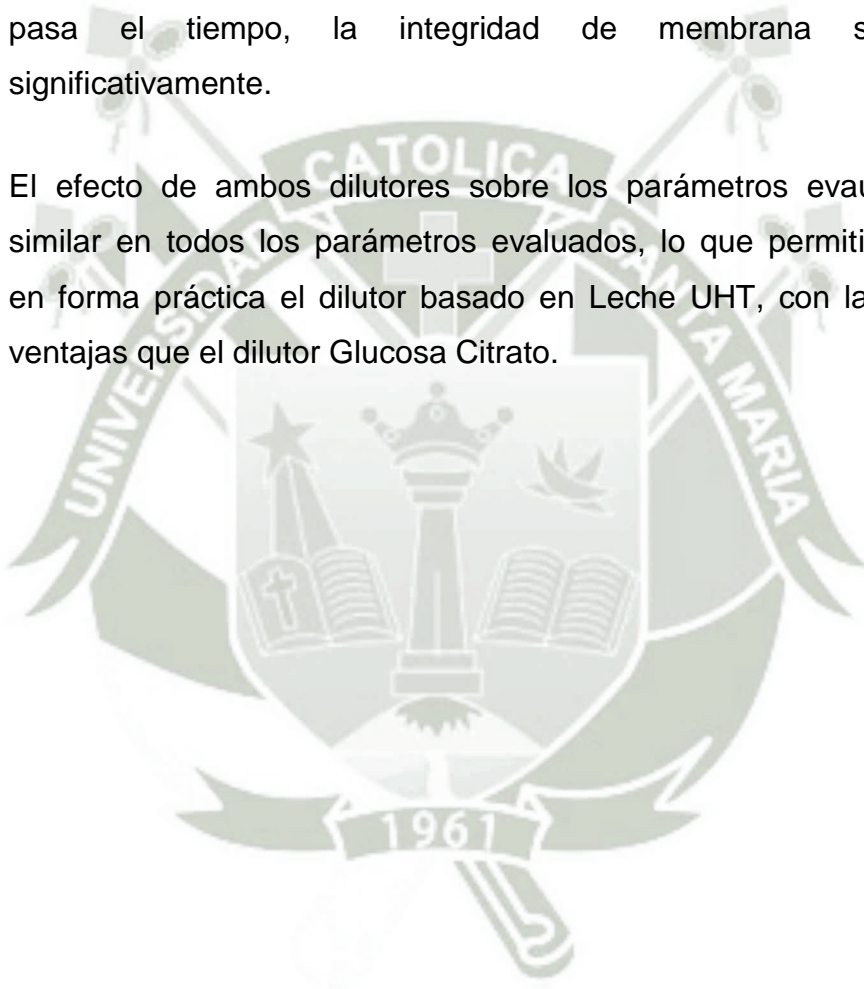


III. CONCLUSIONES

1. Se halló un valor promedio final de volumen de semen de $1,88 \pm 0,30$ ml, correspondiente a la segunda fracción.
2. Con relación al color del semen, el color predominante fue de Blanco lechoso, a excepción de un espécimen que mostró dos muestras de color Blanco Opalescente.
3. En referencia a la concentración de espermatozoides al inicio del estudio, se encontró un valor de $470,48 \pm 47,93 \times 10^6$ células espermáticas, el cual fue considerado normal.
4. Con relación a la motilidad se observó un valor inicial de 95,7%, pero luego de someter las muestras a las horas de evaluación (24, 36 y 48 horas) se apreció una diferencia estadística significativa entre ellas ($P < 0.05$), debido principalmente a un efecto acumulativo del shock hipotérmico. Asimismo, no se halló efecto del dilutor entre las horas evaluadas ($P > 0.05$)
5. El efecto de la adición de los dos dilutores sobre el semen canino afectó significativamente ($P < 0.05$) la viabilidad de los espermatozoides en el tiempo, mostrando valores iniciales similares en ambos dilutores (88,65%) y este valor disminuyó progresivamente hasta alcanzar valores de 62,30% en el caso del dilutor en base a leche UHT y 63% para el dilutor glucosa citrato. Asimismo, no se halló efecto del dilutor entre las horas evaluadas ($P > 0.05$)
6. Con relación a las anomalías morfológicas, el porcentaje promedio de espermatozoides normales fue de 80%, las anomalías halladas corresponden a la pieza intermedia, donde se han encontrado un

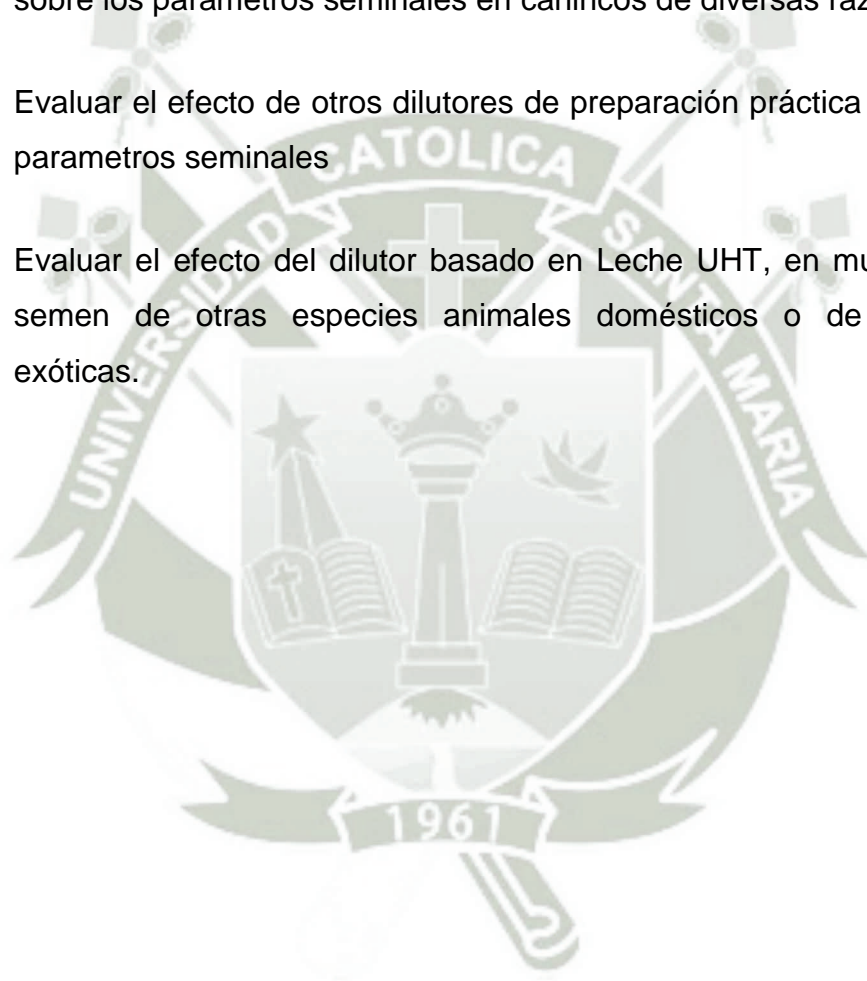
porcentaje de 15,7% de gotas citoplasmática proximales y 4,35% de gotas citoplasmática dístales.

7. En relación a la integridad de membrana, no se hallaron efectos de los dilutores; sin embargo, durante las horas de evaluación se observa una disminución lineal en el tiempo, estos valores difirieron significativamente ($P < 0.05$), lo cual permite establecer que conforme pasa el tiempo, la integridad de membrana se altera significativamente.
8. El efecto de ambos dilutores sobre los parámetros evaluados fue similar en todos los parámetros evaluados, lo que permitiría utilizar en forma práctica el dilutor basado en Leche UHT, con las mismas ventajas que el dilutor Glucosa Citrato.



9. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda evaluar el dilutor basado en Leche UHT y su efecto sobre la inseminación artificial en caninos.
2. Se recomienda evaluar el efecto del dilutor basado en Leche UHT sobre los parametros seminales en caninos de diversas razas.
3. Evaluar el efecto de otros dilutores de preparación práctica sobre los parametros seminales
4. Evaluar el efecto del dilutor basado en Leche UHT, en muestras de semen de otras especies animales domésticos o de especies exóticas.



10. BIBLIOGRAFÍA

1. Álamo, D. 2007. Crioconservación y Viabilidad Espermática En La Especie Canina: Utilización De Nitrógeno Líquido Vs Ultracongelador De – 152 °C. Tesis Doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. España.
2. Álamo, D., Batista M, González F, Rodríguez N, Cruz G, Cabrera F, Gracia A (2005): Cryopreservation of semen in the dog: use of ultra-freezers of -152 °C as a viable alternative to liquid nitrogen. *Theriogenology*, 63: 72-82.
3. Allen, W.E. (1992): *Fertility and Obstetrics in the Dog*. Ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp: 33-55; 136-140.
4. Arthur GH, Noakes DE, Pearson H (1991): *Reproducción y Obstetricia en Veterinaria*. Ed. Interamericana McGraw-Hill, Méjico, pp: 563-579.
5. Badinand F, Fontbonne A, Adoue C (1990): Préparation, conditionnement, conservation et utilisation de la semence du chien en insémination artificielle. *El. Et. Ins.*, 239: 15.
6. Baquero, J., Pardo, E., y P. Cruz (2004). Evaluación de dos diluyentes para la conservación de semen canino bajo condiciones de refrigeración: Efectos del tiempo de refrigeración, grado de dilución y de la concentración de fructosa. *Orinoquia*, año/vol. 8, número 001 Universidad de los Llanos, Villavicencio, Colombia.

7. Barth AD, Oko RJ (1989): Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa. Ed. Iowa State University Press/Ames, Iowa, pp: 8-18.
8. Batellier, F.; M., Vidament; J. Fauquant; G. Duchamp; G. Arnaud; J. Yvon; M. Magistrini. 2001. Advances in cooled semen technology. *Animal Reprod. Sci.* 68:181-190.
9. Batista M, González F, Cabrera F, Forga J, Gracia A (1998): Segmental aplasia of the epididymis in a Siberian Husky. *The Veterinary Record*, 142: 250-251.
10. Batista M, González F, Cabrera F, Calero P, Gracia A (2000): Morphologic and endocrinologic characteristics of retained canine testes. *Canine Practice*, 25: 12-15.
11. Bearden HJ, Fuquay JW. 1997: *Applied Animal Reproduction*. Ed. Prentice-Hall, New Jersey, pp: 147- 157.
12. Bouchard, G.F., Morris, J.K., Sikes, J.D., Youngquist, R.S. 1990. Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoal motility. *Theriogenology*, Vol. 34, No. 1, pp. 147 – 157.
13. Burke TJ (1986): *Small Animal Reproduction and Infertility*. Ed. Lea and Febiger, Philadelphia, pp: 207-217.
14. Cabrera F (1999): *Producción y Congelación Seminal en la Variedad Majorera de la Agrupación Caprina Canaria*. Tesis Doctoral, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.
15. Cain, J.L. 2001. An overview of canine reproduction services. *Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, March, Vol. 31, No. 2, pp. 209 – 218.

16. Christiansen IJ (1984): Reproducción in the Dog and Cat. Ed. Baillière Tindall, Londres, pp: 12-21
17. Concannon PW (1993): Biology of gonadotropin secretion in adult and prepubertal female dogs. J. Reprod. Fertil. (Suppl.), 47: 3-27.
18. Dinsdate, D.; J. Zhuang; G. Cohen. 1998. Redistribution of cytochrome precedes the caspase-dependent formation of ultracondensed mitochondria with a reduced inner membrane potential, in apoptotic monocytes. Am. J. Pathol. 155: 607-618.
19. England, G.C.W.; Allen, W.E. 1989. Seminal characteristics and fertility in dogs. Veterinary Record 125, 399.
20. England GC (1999): Semen quality in dogs and the influence of a short-interval second ejaculation. Theriogenology, 52: 981-986.
21. Fastard W. (1998b) - Mating and artificial insemination in the dog. In G Simpson (Ed), Manual of Small Animal Reproduction and Neonatology, Cap. 9; pp 102-103, BSAVA, UK.
22. Farstad W (2000a): Cubrición e inseminación artificial en el perro. En: Manual de Reproducción y Neonatología en Pequeños Animales (GM Simpson, GC England, MJ Harvey). Ediciones S, Barcelona, pp: 1125-1138.
23. Farstad, W. 1996. Semen cryopreservation in dogs and foxes. Animal Reproduction Science, Vol. 42, pp 251 – 260.
24. Farstad W (2000b): Assisted reproductive technology in canid species. Theriogenology, 53: 175-186.

25. Frandson RD, Spurgeon TL (1995): Anatomía y Fisiología de los Animales Domésticos. Ed. Interamericana McGraw-Hill, Méjico, pp: 386-409.
26. Fogle B (1996): Enciclopedia del Perro. Ed Omega, Barcelona, pp: 6-35.
27. Foote RH (1962): Survival bull sperm in milk and yolk extenders with added catalase. J. Dairy Sci., 45: 907-910.
28. Foote RH, Arriola J (1987): Motility and fertility of bull sperm frozen-thawed differently in egg yolk and milk extenders containing detergent. J. Dairy Sci., 70: 2642-2647.
29. Goodman, M.; J. Cain. 1993. Retrospective evaluation of artificial insemination with chilled extended semen in the dog. J. Reprod. Fert., Suppl. 47: 554.
30. Green, D.; D. Reed. 1998. Mitochondria and apoptosis. Science 281: 1309-1312.
31. Hay MA, King WA, Gartley CJ, Leibo SP, Goodrowe KL (1997): Canine spermatozoacryopreservation and evaluation of gamete interaction. Theriogenology, 48: 1329-1342.
32. Hewitt DA (2000): Fisiología y endocrinología del macho. En: Manual de Reproducción y Neonatología en Pequeños Animales. (GM Simpson, GC England, MJ Harvey). Ediciones S, Barcelona, pp: 79-90.
33. Hishinuma M, Sekine J (2004): Separation of canine epididymal spermatozoa by percoll gradient centrifugation. Theriogenology, 61: 365-372.

34. Holt, W.V. 2000. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, Vol. 53, 1 January, pp. 47 – 58.
35. Howard J, Bush M, Wildt DE (1986): Semen collection analysis and cryopreservation in nondomestic mammals. En: *Current Therapy in Theriogenology* (Morrow DA). Ed. WB Saunders, Philadelphia, pp: 1047-1053.
36. Iguer-Ouada, M.; J. Verstegen. 2001. Long term preservation of chilled canine semen: Effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology* 55: 671-684.
37. Iguer-ouada M (2001): Procréation Médicalement Assistée dans l'Espèce Canine: Analyse et Préservation à 4 °C du Sperme. Tesis Doctoral, Universidad de Liège. Bélgica.
38. Jeyendran, R.S.; Van Der Ven, H.H.; Perez-Pelaez, M.; Crabo, B.G.; Zaneveld, L.J.D. (1984) - Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationships to other semen characteristics. *J Reprod Fert* 70: 219-228.
39. Johnston S, Kustritz M, Olson P (2001): Canine and Feline *Theriogenology*. Ed. WB Saunders, Philadelphia, pp: 1-104, 275-306.
40. Jones RC (1969): Influence of diluents and processing times after ejaculation on the survival of deepfrozen ram spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.*, 22: 995-1004.
41. Iguer-ouada M, Verstegen JP (2001): Long-term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology*, 55: 671-684.

42. Illera M (1984): Endocrinología Veterinaria y Fisiología de la Reproducción. Ed. Colibac, Madrid, pp: 209-315.
43. Kao, S.; H. Chao; Y. Wei. 1998. Multiple deletions of mitochondrial DNA are associated with the decline of motility and fertility of human spermatozoa. Mol. Hum. Reprod. 4: 657-666.
44. Keenan L (2000): Infertilidad en el macho. En: Manual de Reproducción y Neonatología en Pequeños Animales (GM Simpson, GC England, MJ Harvey). Ediciones S, Barcelona, pp: 109-124.
45. Kustritz, M.V.R.; Olson, P.; Johnston, S.D.; Root, T.K. (1998) - The effects of stains and investigators on assessment of morphology of canine spermatozoa. J Am Anim Hosp Assoc 34: 348-352.
46. Kutzler MA (2005a): Semen collection in the dog. Theriogenology, 64: 747-754.
47. Kutzler MA (2005b): Induction and synchronization of estrus in dogs. Theriogenology, 64: 766-775.
48. Linde-Forsberg, C. 2001. Regulations and recommendations for international shipment of chilled and frozen canine semen. En: Recent Advances in Small Animal Reproduction. Concannon, P.; G. England; J. Verstegen (eds.). Ithaca. International Veterinary Information Service.
49. Manosalva Iris P., Constanza Cortés, Víctor Leyva V., Martha Valdivia C., Mónica De los Reyes S., Claudio Barros R. y Ricardo Moreno M. (2005). Efecto De La Refrigeración Sobre La Motilidad, Integridad De Membrana Acrosomal Y Reacción Acrosomal En Espermatozoides Caninos. Rev Inv Vet Perú; 16 (2): 114-128. Lima – Perú.

50. Martins, A. (2005). Influencia en la Calidad Espermática de la Adición de Distintas Concentraciones de Crioprotectores para la Conservación del Semen Canino. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid. España.
51. Maxwell, W.; L. Johnson. 1999. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology* 52: 1353-1362.
52. Meryman HT (1971): Cryoprotectives agents. *Cryobiology*, 8: 173-183.
53. McDonald LE, Pineda MH (1989): *Endocrinología Veterinaria y Reproducción*. Ed. Interamericana McGraw-Hill, México DF, pp: 448-473.
54. Morton, D.B.; Bruce, S.G. (1989) - Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs. *J Reprod Fertil Suppl* 39: 311-316.
55. Nöthling JO, Shuttleworth R (2005): The effect of straw size, freezing rate and thawing rate upon postthaw quality of dog semen. *Theriogenology*, 63: 1469-1480.
56. Olar TT (1984): *Cryopreservation of Dog Spermatozoa*. Ph.D. Dissertation. Colorado State University, Fort Collins, CO. Cit en Peña A (1997): *Supervivencia y Fertilidad del Semen Canino Sometido a Congelación-Descongelación*. Tesis Doctoral, Universidad de Santiago de Compostela.
57. Paramo RM, Renton JP, Ferguson JM, Concannon PW (1993): Effects of medroxyprogesterone acetate or gonadotrophin-releasing hormone agonist on suppression of spermatogenesis in the dog (*Canis Familiaris*). *J. Reprod. Fertil. (Suppl.)*, 47: 387-397.

58. Peña A (1997): Supervivencia y Fertilidad del Semen Canino Sometido a Congelación-Descongelación. Tesis Doctoral, Universidad de Santiago de Compostela.
59. Peña A, Linde-Forsberg C (2000a): Effects of spermatozoal concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. *Theriogenology*, 54: 703-718.
60. Peña A, Linde-Forsberg C (2000b): Effects of Equex, one- or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology*, 54: 859-875.
61. Peña AI (2004): Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Anim. Reprod. Sci.*, 82: 209-224.
62. Rigau T, Farré M, Balleste J, Mogas T, Peña A, Rodríguez-Gil JE (2001): Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh eyaculates. *Theriogenology*, 56: 801-815.
63. Rijsselaere T, Van Soom A, Maes D, de Kruif A (2002): Effect of centrifugation on in vitro survival of fresh diluted canine spermatozoa. *Theriogenology*, 57: 1669-1681.
64. Rijsselaere T, Van Soom A, Maes D, de Kruif A (2003): Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyzer. *Theriogenology*, 60: 1553-1568.
65. Rodríguez-Gil JE, Montserrat A, Rigau T (1994): Effects of hypoosmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa. *Theriogenology*, 42: 815-829.
66. Rota, A., Ström, B., Lindeforsberg, C. 1995. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. *Theriogenology*. 15 October, Vol. 44, No. 6, pp. 885 – 900.

67. Rota A, Iguer-ouada M, Verstegen J, Linde-Forsberg C (1999a): Fertility after vaginal or uterine deposition of dog semen frozen in a Tris extender with or without Equex STM Paste. *Theriogenology*, 51: 1045-1058.
68. Rota A, Peña AI, Linde-Forsberg C, Rodríguez-Martínez H (1999b): In vitro capacitation of fresh, chilled and frozen-thawed dog spermatozoa assessed by the chlortetracycline assay and changes in motility patterns. *Anim. Reprod. Sci.*, 57: 199-215.
69. Ruberte J, Sautet J (1998): Atlas de Anatomía del Perro y del Gato (3): Abdomen, Pelvis y Miembro Pelviano. Ed. Multimédica, Barcelona, pp: 112-119.
70. Salamon S (1968): Deep-freezing of ram semen: recovery of spermatozoa after pelleting and comparison with other methods of freezing. *Aust. J. Biol. Sci.*, 21: 351-360.
71. Sandoval J (2000): Tratado de Anatomía Veterinaria. Tomo III: Cabeza y Sistemas Viscerales. Ed. Facultad de Veterinaria-Universidad de León, León, pp: 359-387.
72. Sánchez, A.; W. von Frey; M. de Los Reyes. 1995. Efecto de diluyentes y plasma seminal en la preservación de espermatozoides equinos refrigerados. *Vet. Arg.* 113: 172-178.
73. Sánchez, A.; T. Tsutsui. 2002. Evaluación de dos diluyentes seminales para la preservación refrigerada de espermatozoides de gato (*Felis catus*). *Revista Científica, FCV-LUZ* 12: 249-253.
74. Sánchez, A., Cartagena, A., y M. Berland (2006). Comparación del Efecto de dos Diluyentes sobre la Fertilidad Potencial de Semen Canino Refrigerado. *Rev Inv Vet Perú*; 17 (1): 1-7. Lima – Perú.

75. SENAMHI. 2005. Delimitación de la Cuenca Atmosférica de Arequipa. Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología. Arequipa, junio - 2005.
76. Silva LD, Verstegen JP (1995): Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology*, 44: 571-579.
77. Silva LD, Onclin K, Lejeune B, Verstegen JP (1996): Comparisons of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen. *The Veterinary Record*, 138: 154-157.
78. Threlfall W (2005): Recolección y evaluación del semen. En: *Manual de Reproducción del Perro y del Gato* (Root Kustritz MV). Multimédica Ediciones Veterinarias, Barcelona, pp: 43-54.
79. Vázquez JM, Ramírez G, Gil F, Latorre R, Moreno F, López O, Orenes M, Arencibia A (2000): *Atlas de Anatomía Clínica del Perro y Gato: Cavidades Torácica, Abdominal y Pelviana*. Ed. Novograf SA, Murcia, pp: 119-122.
80. Verstegen JP, Onclin K, Iguer-ouada M (2005a): Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris-glucose extender: in vitro and in vivo studies. *Theriogenology*, 64: 720-733.
81. Vetter, C.; J. Miller; L. Crawford; M. Armstrong; J. Clair; M. Conner; D. Wise; T. Skopel. 1998. Comparison of motility and membrane integrity to assess rat sperm viability. *Reprod. Toxicol.* 12: 105-114.
82. Watson PF (1990): Artificial insemination and preservation of semen. En: *Marshall's Physiology of Reproduction. 2: Reproduction in the Male* (Laming GE). Ed Churchill Livingstone, Edimburgo, pp: 747-869.

83. Yamada, S., Shimazu, Y., Kawaji, H., Nakazawa, M., Naito, K., Toyoda, Y. 1992. Maturation, fertilization, and development of dog oocytes in vitro. *Biology of Reproduction*, Vol. 46, pp. 852 – 858.



XIII.- ANEXOS

ANEXO 1

FICHA DE LABORATORIO.

LECTURA DE EVALUACION SEMINAL

NOMBRE

ANIMAL.....

EDAD.....

OBSERVACIONES.....

.....

PROPIETARIO.....

.....

FECHA

Y

HORA

OBTENCION

MUESTRA.....

PARÁMETRO	HORA 0	HORA 24	HORA 36	HORA 48
Volumen (ml)				
Color (blanco lechoso, blanco opalescente, otro)				
Motilidad (%)				
Viabilidad (%)				
Morfología (% de cada categoría)				
Concentración (espermatozoides por ml)				
Integridad de membrana (%)				

.....
RESPONSABLE

1.

ANEXO 2

PARAMETROS SEMINALES EVALUADOS EN CADA ESPECIMEN.

Perro 1

Muestra 1							
Hora	motilidad	viabilidad	concentración	IM	color	Morfología	
0	92	81	567850000	80	blanco lechoso	Normal	85
24	85	76		75		Gota CP	10
36	60	68		72		Gota CD	5
48	50	51		71			
			2050000				
Muestra 2							
Hora	motilidad	viabilidad	concentración	IM	color	Morfología	
0	95	90	362850000	92	blanco lechoso	Normal	86
24	88	82		80		Gota CP	11
36	71	73		77		Gota CD	3
48	60	62		70			
			2050000				
Muestra 3							
Hora	motilidad	viabilidad	concentración	IM	color	Morfología	
0	96	90	528900000	93	blanco lechoso	Normal	80
24	90	88		90		Gota CP	14
36	79	80		82		Gota CD	6
48	70	71		80			
			2050000				
Muestra 4							
Hora	motilidad	viabilidad	concentración	IM	color	Morfología	
0	90	91	451000000	95	blanco lechoso	Morfología	
24	82	80		80		Normal	79
36	76	73		78		Gota CP	16
48	60	62		75		Gota CD	5

Perro 2

Muestra 1									
Hora	volumen 2	motilidad	viabilidad	concentración	IM	color	color	Morfología	
0	2	90	80	516600000	83		blanco lechoso	Normal	79
24		82	78		75			Gota CP	17
36		60	68		72			Gota CD	4
48		55	48		68				
				2050000					
Muestra 2									
Hora	volumen 2	motilidad	viabilidad	concentración	IM			Morfología	
0	2,5	92	89	434600000	90		blanco lechoso	Normal	82
24		87	82		83			Gota CP	15
36		70	74		72			Gota CD	3
48		62	64		69				
				2050000					
Muestra 3									
Hora	volumen 2	motilidad	viabilidad	concentración	IM			Morfología	
0	2	94	91	584250000	92		blanco lechoso	Morfología	
24		90	83		89			Normal	75
36		78	80		83			Gota CP	20
48		70	74		78			Gota CD	5
				2050000					
Muestra 4									
Hora	volumen 2	motilidad	viabilidad	concentración	IM			Morfología	
0	2	89	90	475600000	94		blanco lechoso	Morfología	
24		81	80		85			Normal	82
36		75	71		76			Gota CP	16
48		60	74	2050000	70			Gota CD	2

Perro 3

Muestra 1								
Hora	volumen 2	motilidad	viabilidad	concentración	IM	color	Morfología	
0	2	93	82	399750000	80	blanco lechoso	Normal	78
24		86	76		75		Gota CP	18
36		59	65		72		Gota CD	4
48		52	52		71			
				2050000				
Muestra 2								
Hora	volumen 2	motilidad	viabilidad	concentración	IM	color	Morfología	
0	2	92	90	387450000	92	blanco lechoso	Normal	80
24		88	81		80		Gota CP	15
36		70	75		77		Gota CD	5
48		61	64		70			
				2050000				
Muestra 3								
Hora	volumen 2	motilidad	viabilidad	concentración	IM	color	Morfología	
0	1,5	96	90	434600000	93	blanco lechoso	Morfología	
24		88	82		90		Normal	78
36		79	80		82		Gota CP	15
48		71	69		80		Gota CD	7
				2050000				
Muestra 4								
Hora	volumen 2	motilidad	viabilidad	concentración	IM	color	Morfología	
0	1,5	91	93	414100000	95	blanco lechoso	Morfología	
24		83	82		80		Normal	82
36		77	74		78		Gota CP	16
48		60	60		77		Gota CD	2

Perro 4

Muestra 1

Hora	volumen 2	motilidad	viabilidad	concentración	IM	color	Morfología	
0	1,5	89	88	434600000	80	blanco lechoso	Normal	75
24		80	76		75		Gota CP	18
36		61	68		72		Gota CD	7
48		53	51		69			
				2050000				

Muestra 2

Hora	volumen 2	motilidad	viabilidad	concentración	IM	color	Morfología	
0	1,5	92	90	496100000	91	blanco lechoso	Normal	81
24		88	82		79		Gota CP	15
36		73	77		75		Gota CD	4
48		61	61		72			
				2050000				

Muestra 3

Hora	volumen 2	motilidad	viabilidad	concentración	IM	color	Morfología	
0	2	95	90	440750000	92	blanco lechoso	Morfología	
24		90	88		88		Normal	75
36		79	79		82		Gota CP	18
48		68	72		79		Gota CD	7
				2050000				

Muestra 4

Hora	volumen 2	motilidad	viabilidad	concentración	IM	color	Morfología	
0	1,5	92	92	483800000	93	blanco lechoso	Morfología	
24		83	81		81		Normal	82
36		77	74		75		Gota CP	15
48		61	63		73		Gota CD	3

Perro 5

Muestra 1

Hora	volumen 2	motilidad	viabilidad	concentración	IM	color	Morfología	
0	2	90	82	453050000	79	blanco lechoso	Normal	82
24		86	77		76		Gota CP	15
36		59	69		73		Gota CD	3
48		52	52		69			
				2050000				

Muestra 2

Hora	volumen 2	motilidad	viabilidad	concentración	IM	color	Morfología	
0	2	94	91	496100000	91	blanco lechoso	Normal	80
24		87	80		79		Gota CP	17
36		72	74		78		Gota CD	3
48		62	63		68			
				2050000				

Muestra 3

Hora	volumen 2	motilidad	viabilidad	concentración	IM	color	Morfología	
0	2	95	92	533000000	92	blanco lechoso	Morfología	
24		91	88		89		Normal	76
36		80	82		81		Gota CP	18
48		72	72		79		Gota CD	6
				2050000				

Muestra 4

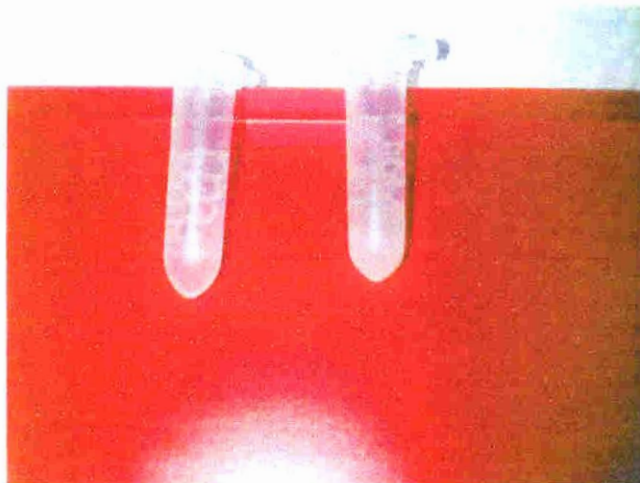
Hora	volumen 2	motilidad	viabilidad	concentración	IM	color	Morfología	
0	1,5	91	92	514550000	94	blanco lechoso	Morfología	
24		83	81		79		Normal	82
36		77	74		77		Gota CP	15
48		62	61		72		Gota CD	3

ANEXO 3

IMAGENES



Evaluación del volumen



Evaluación del color



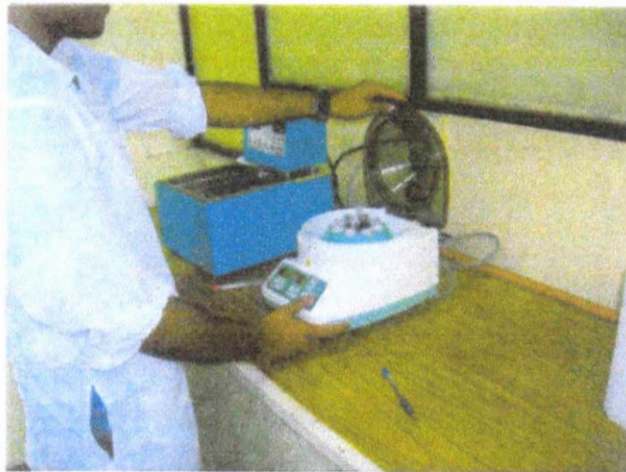
Baño María para la incubación de muestras



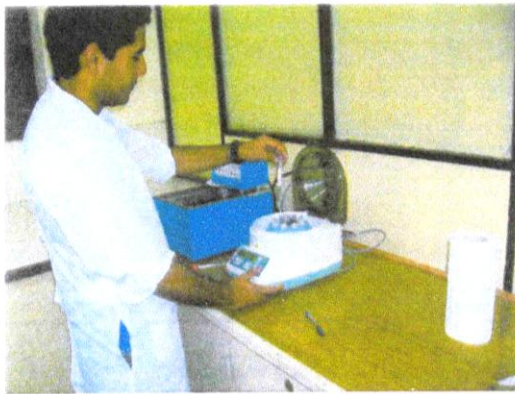
Centrífuga (2200 RPM X 4 minutos)



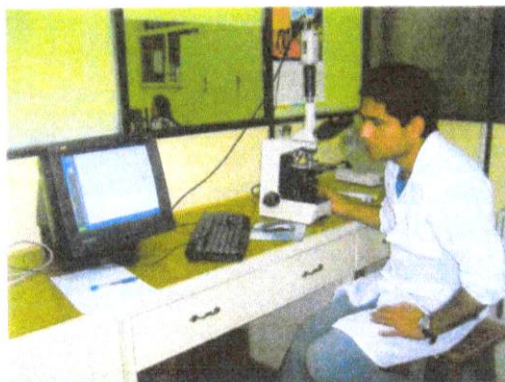
Incubación de muestras



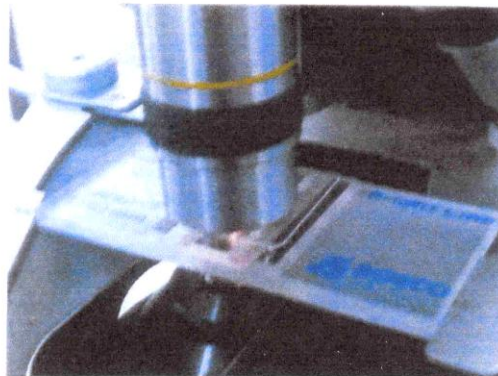
Centrifugación de muestras



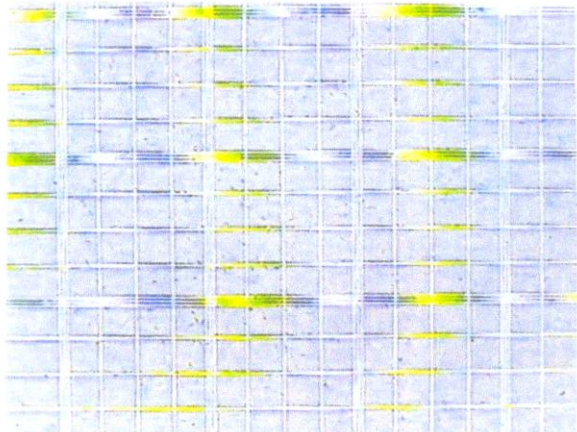
Recojo de muestras centrifugadas



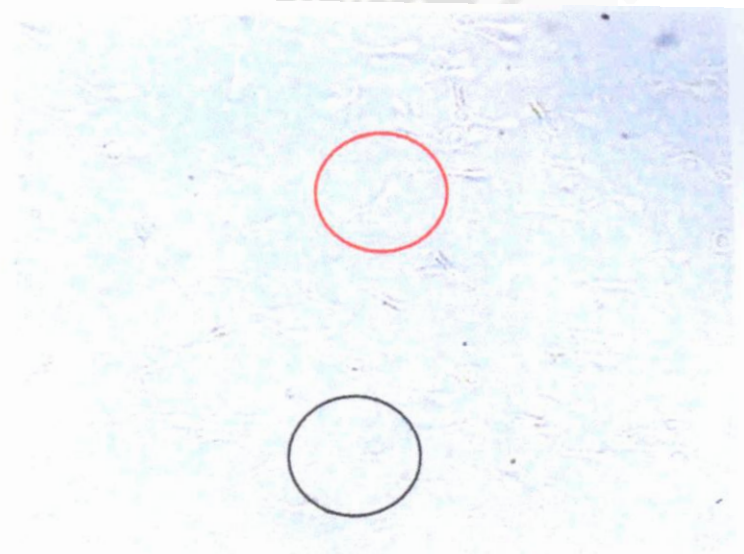
Evaluación microscópicas



Cámara de Neubauer para conteo



Evaluación de la concentración

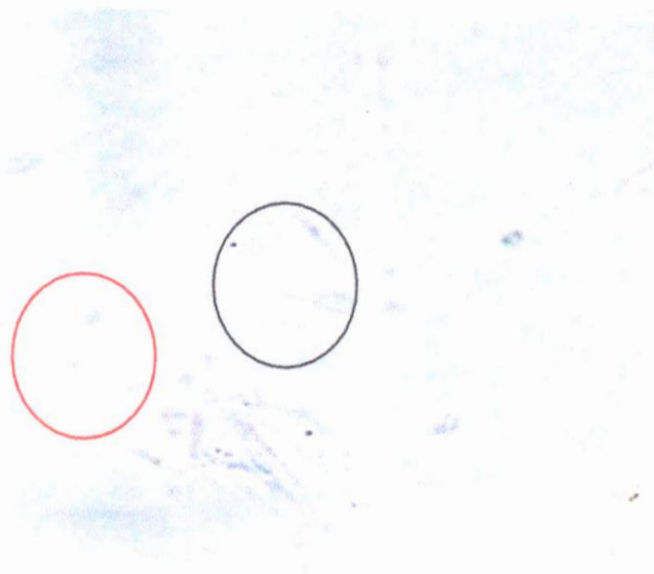


Evaluación de la integridad de membrana

- Membrana intacta (circulo rojo)
- Membrana alterada (circulo negro)



Evaluación de la morfología



Evaluación de la morfología.

- Gota citoplasmática proximal (círculo negro)
- Gota citoplasmática distal (círculo negro)

