



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

SUPERVIVENCIA Y VIABILIDAD ESPERMÁTICA CANINA USANDO DILUYENTES DE  
SEMEN Y CONCENTRACIONES CRIO PROTECTORAS EN TODA LA CADENA  
DE CRIO PRESERVACIÓN DE SEMEN

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos  
para optar por el título de Médico Veterinario Zootecnista

Profesor Guía  
Ing. María José Amores

Autor  
Mario David Vaca Granda

Año  
2016

## **DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA**

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

---

Ing. María José Amores  
C.I. 1711857134

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”.

---

Mario David Vaca Granda  
C.I. 1723724546

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, a mis padres: Ana y Mario por todo su apoyo, mi hermana Alexandra, mastineros de México DF, M.A.P.A (Molosso Di Altezza Del Pacifico Azul), Ingeniera María José Amores por toda su ayuda y apoyo.

**DEDICATORIA**

A Dios, mis padres y a las mascotas que me han acompañado a lo largo de toda mi vida.

## RESUMEN

Se desarrolló un protocolo de crío preservación de semen canino, estandarizando el manejo y empleo de un laboratorio de reproducción en un criadero ubicado en la provincia de Cotopaxi, sector Lasso. Para este estudio, se evaluaron ocho perros que cumplieron los criterios de inclusión y exclusión establecidos, de los animales se tomaron ocho muestras con dos repeticiones, cada muestra fue evaluada con cuatro tratamientos. La evaluación de los resultados fue en dos fases: una en la dilución del tratamiento y la muestra y otra cuando se descongeló el semen. Los datos obtenidos fueron en referencia a la evaluación de: motilidad, concentración, pH y morfología espermática (anormalidades primarias y secundarias). Los resultados, para los cuales se usó tres pruebas estadísticas (T.test, ADEVA, Dunkan), fueron que los espermatozoides de los tratamientos 3(Triadyl®) y 4 (Método Noruego), no eran ideales para la fecundación por lo que no justifica su reserva como material para inseminación. Los tratamientos 1 (CaniPlus®) y 2(CaniPro ®), según los resultados obtenidos pueden ser usados para inseminación por lo que se justifica su crío preservación y reserva.

## ABSTRACT

It was developed a cryopreservation protocol of canine semen. Standardizing the handling and usage of a reproduction laboratory in a breeding place located in the Cotopaxi province, sector Lasso. For this study, eight dogs were evaluated and these satisfied the inclusion and exclusion criteria. From these animals, eight samples were taken with two repetitions each one and each sample was evaluated with 4 different treatments. The results evaluation were evaluated in two phases. The first one was the treatments dilution and the sample and the second one was when the semen was unfreeze. The data obtained was in reference of evaluating: motility, concentration, pH, spermatomorfology (primary and secondary abnormalities). For the results 3 statistic tests were used (T.test, ADEVA, Duncan). The spermatozoids of the third treatment (Triadyl®) and the fourth (MetodoNoruego), were not suitable for fertilization. For this reason, these two treatments were not used as a insemination material. According to the results, treatments 1 (CaniPlus®) and 2 (CaniPro ®), can be used for inseminate and justifies their cryopreservation and reservation.

# ÍNDICE

INTRODUCCIÓN .....	1
1. CAPÍTULO I: OBJETIVOS.....	4
1.1 OBJETIVO GENERAL. ....	4
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
1.3 HIPÓTESIS.....	4
2. CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO. ....	5
2.1 GENERALIDADES DEL APARATO GENITAL MASCULINO (CANINO).....	5
2.2 ÓRGANOS GENITALES DEL CANINO (MACHO). ....	5
2.3 ANATOMÍA FUNCIONAL DEL MACHO CANINO. ....	8
2.3.1 Espermatogénesis.....	11
2.3.2 Eje hipotálamo- hipofisario- testicular.....	13
2.4 RECOLECCIÓN DE SEMEN CANINO.....	15
2.4.1 Consideraciones previas del procedimiento.....	16
2.4.2 Procedimiento. ....	16
2.4.3 Cuidados posteriores y complicaciones. ....	17
2.5 EVALUACIÓN SEMINAL.....	18
2.5.1 Consideraciones previas del procedimiento.....	18
2.5.2 Procedimiento .....	18
2.5.3 Parámetros normales del semen.....	22
2.5.4 Pruebas varias. ....	22
2.5.5 Sistemas Automatizados.....	23
2.6 CONGELACIÓN DE SEMEN .....	23
2.6.1 Consideraciones.....	23
2.6.2 Procesamiento. ....	25
2.6.3 Complicaciones de congelación seminal en caninos. ....	25
2.7 CRIO PROTECTOR Y DILUYENTE DE SEMEN CANINO.....	26
2.7.1 Interacción de células y crio preservación.....	26

2.7.2 Crio protectores de semen canino.....	27
<b>3.    CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
3.1 MATERIALES: .....	29
3.1.1MATERIALES BIOLÓGICOS: .....	29
3.1.2 Materiales de laboratorio y equipos:.....	29
3.1.3 Ingredientes para las diluciones y diluciones crio protectoras registradas: .....	29
3.2 METODOLOGÍA.....	29
3.2.1. Ubicación geográfica del experimento: .....	29
3.2.2 Características de la unidad experimental: .....	30
3.2.3 Factores en estudio:.....	31
3.2.4 Variables en estudio.....	32
3.2.5 Diseño experimental.....	32
3.2.6 Manejo del experimento. ....	34
3.2.7 Medición de las variables. ....	36
3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO. ....	37
<b>4.    CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>38</b>
4.1 ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DEL SEMEN FRESCO. ....	38
4.2 MOTILIDAD ESPERMÁTICA: .....	39
4.2.1 Motilidad en la fase dilución.....	39
4.2.2 MOTILIDAD EN LA FASE POST-CONGELAMIENTO. ....	41
4.3 CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA.....	44
4.3.1 Concentración en la fase de dilución. ....	44
4.3.1 Concentración en la fase post-congelamiento. ....	45
4.4 MEDIDA DE PH DE LA MUESTRA.....	47
4.4.1 pH en la fase de dilución. ....	47
4.4.2 Medición de pH en la fase post-congelamiento.....	48
4.5 DEFECTOS PRIMARIOS. ....	51
4.5.1 Defectos primarios en la fase de dilución. ....	51

4.5.2	DEFECTOS PRIMARIOS EN LA FASE DE DILUCIÓN POST- CONGELAMIENTO.....	52
4.6.1	Defectos secundarios en la fase de dilución.....	54
4.6.2	Defectos secundarios en la fase de post-congelamiento.....	55
5.	<b>CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.</b> .....	58
5.1	CONCLUSIONES.....	58
5.2	RECOMENDACIONES. ....	59
	REFERENCIAS.....	61
	ANEXOS .....	64

## INTRODUCCIÓN

El veterinario debe generar buenas relaciones con los criadores caninos brindando ayuda hasta el punto de ser indispensable para procedimientos como: indicar el momento para el apareamiento de la hembra canina, evaluación seminal y todos los procedimientos que implican la manipulación de semen. El trabajo con semen incluye: extracción, análisis, transporte, inseminación, entre otros. Los conocimientos sobre fisiología y patología son indispensables para el desarrollo de la reproducción canina ya que no solo se perfeccionan las técnicas y protocolos utilizados sino que también ayudan en el control de enfermedades genitales contagiosas como *Brucella canis* y herpesvirus, enfermedades bacterianas y otras como la tos de las perreras.

La congelación de semen canino es un proceso que está documentado en varias publicaciones a lo largo de los años. Con el paso del tiempo se van obteniendo mejores resultados que van desde un 50% hasta el 100% de preñez efectiva como lo cita Stornelli (2001) en varias publicaciones realizadas desde el año 1993, por lo que es necesario seguir desarrollando las técnicas para el mismo. Stornelli (2001) detalla que Lazzaro Spallanzani en 1787 logró la primera inseminación artificial (IA) en caninos utilizando semen fresco. Él mismo, analizó que el semen a bajas temperaturas con respecto a su actividad metabólica espermática podía tener una baja reversible (Spallanzani, 1776). Harrop, en 1956, logró la primera preñez con semen refrigerado en caninos (Harrop, 1960, p.87-99) y en el año de 1969 se reportó el éxito en una concepción canina con semen refrigerado (Seager, 1969).

La congelación de semen canino ha sido un procedimiento de difícil realización para la medicina veterinaria en la práctica diaria por los equipos a requerirse. La biotecnología en el mundo actual se encuentra en constante evolución, por lo que la IA (Inseminación artificial) es cada vez más frecuente. Sin embargo, los factores que determinan el éxito de la preñez en caninos son el estado de salud de los animales, mantener una adecuada nutrición para el momento de la IA en la hembra y la técnica de inseminación, pero lo más importante es tener

semen viable para la inseminación (Stornelli, 2001, p.59). La mayoría de países en Sudamérica cuentan con estudios experimentales sobre la congelación de semen canino como los de diferenciación en niveles de glicerol para la congelación de semen canino en Brasil (Rodríguez, 2007, pp.25-28), congelación supervivencia y viabilidad espermática canina (Stornelli, 2007) de Argentina, determinación de protocolos en crio preservación de semen canino (Bohorquez, 2005), Sánchez (2006) de Perú habla de investigaciones sobre diluyentes. El Ecuador tiene pocos estudios de la crio preservación de semen canino. (Jara, 2014).

La congelación de semen deberá brindar un semen de calidad después de la descongelación siendo necesarias pruebas de factibilidad. Usando técnicas de congelación es posible tener semen de un macho que no pueda rendir como reproductor, inseminar una hembra en una localización distante y almacenar semen del reproductor sin que este sea requerido para los servicios (Stornelli, 2001, p.62). En muchos países del mundo las asociaciones de criadores controlan el uso de la IA, decidiendo el derecho a realizar IA o congelación de semen canino justificando su accionar por controlar la identidad de los donantes pero dejando un espacio para que puedan incumplir reglas éticas como decidir que animales pueden o no tener una preservación de su material genético sin ningún tipo de auditoria (Wanke, 2006, p.175). Por lo que el veterinario debe conocer a cabalidad los procesos de congelación seminal para poder juzgar el accionar correcto de cualquier grupo o asociación. Así mismo, un banco de semen puede constituir un importante reservorio genético para la cinofilia y para la conservación de razas en las que la población pueda disminuir drásticamente en el futuro (Stornelli, 2001, p.62).

La congelación no solo va a permitir la conservación de semen de ejemplares valiosos sino que posibilitará la utilización de este semen en generaciones posteriores al ejemplar del cual se obtuvo el semen (Wanke, 2006, p.175). El proceso de congelación y descongelación resulta en una reducida fertilidad, comparada con semen fresco por una pérdida de viabilidad espermática así como de daño en la población espermática sobreviviente (Stornelli, 2001, p.62).

Se estima que entre el 40 y 50% de la población de espermatozoides no sobrevive al proceso de congelación y descongelación. Por otro lado, parte de la población de espermatozoides que sobreviven habrán sufrido daños que los hacen incapaces de fecundar (Watson, 2000). Las mejores tasas de preñez obtenidas utilizando semen refrigerado se lograron con diluyentes a base de tris/yema de huevo (62,5 %), yema de huevo/crema (51,1 %) y glicerol (Fosberg, 1996). La IA (inseminación artificial) con semen congelado en nuestro país requiere un mayor desarrollo de su metodología, habiéndose limitado solamente al trabajo con semen fresco (Jara, 2014).

Ecuador al ser uno de los países más biodiversos del mundo debe hacer más esfuerzos por investigaciones referentes a conservación de su biodiversidad. El uso de técnicas en congelamiento de semen canino, aplicadas a las especies silvestres de la familia *Canidae* o de similares características, es una importante tendencia en el mundo que debe ser aplicada a la conservación de fauna silvestre en el país aprovechando las similares características del material espermático (Enciso, 2006).

## **1. CAPÍTULO I: OBJETIVOS**

### **1.1 Objetivo general.**

Evaluar supervivencia y viabilidad espermática canina usando diluyentes de semen y concentraciones crio protectoras en toda la cadena de crio preservación de semen.

### **1.2 Objetivos específicos.**

1.2.1 Desarrollar un método para crio preservar semen canino en el cual se puede estandarizar, evaluando un sistema de embalaje, un método de congelación y facilidades de almacenamiento.

1.2.2 Analizar supervivencia y viabilidad espermática canina después de la extracción seminal, antes y después de la dilución espermática y después de la descongelación seminal.

1.2.3 Comparar diferentes diluciones de crio perseverantes de semen canino con los mismos componentes pero en diferentes proporciones para congelar semen canino.

### **1.3 Hipótesis.**

$H_0$  Mediante diluyentes de semen y concentraciones crio protectoras se puede tener una supervivencia y viabilidad espermática fecundante de semen canino en toda la cadena de congelación con diferentes diluyentes y mismos resultados

$H_1$ : Mediante diluyentes de semen y concentraciones crio protectoras no se puede tener una supervivencia y viabilidad espermática fecundante de semen canino en toda la cadena de congelación con diferentes diluyentes y mismos resultados.

## **2. CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO.**

### **2.1 Generalidades del aparato genital masculino (canino).**

El aparato genital del canino está formado por testículos, vías espermáticas, glándulas sexuales (próstata, glándulas bulbouretrales) y el pene (Ross, 2009, p. 782).

El testículo tiene dos funciones principalmente: la síntesis de andrógenos u hormonas sexuales así como la formación de espermatozoides o gametos masculinos. Esto se da con los procesos de esteroidogénesis y espermatogénesis respectivamente (Ross, 2009, p.782)

Andrógenos como la testosterona tienen una relación directa con el proceso de espermatogénesis cumpliendo un papel indispensable en el desarrollo del embrión XY, así define el carácter masculino en el fenotipo y el dimorfismo sexual (Ross, 2009, p. 783).

### **2.2 Órganos genitales del canino (macho).**

Anatómicamente el canino en su aparato reproductor cuenta con los siguientes órganos:

Escroto que se encuentra entre la región inguinal y el ano, es un saco membranoso que lleva los testículos en dos cavidades separadas por un septum medio, epidídimo y la parte distal del cordón espermático por un septum medio (Sisson, 1982, p.1732).

Los dos testículos, cada uno suspendido dentro del escroto por un cordón espermático y el músculo cremaster externo, dos epidídimos dos conductos deferentes y el pene (en el canino no existen las glándulas sexuales accesorias). El canino macho además de no tener vesícula seminal y bulbouretral tiene una orientación testicular horizontal, un pene vascular y el depósito de semen en la hembra se produce en la vagina. (Cunningham, 2009, p.518). El testículo canino es un órgano ovoide, normalmente encontrado en

pares, dentro del escroto y fuera de la cavidad abdominal. Los testículos están adheridos al escroto por los ligamentos escrotales se encuentran suspendidos a los cordones espermáticos (Ross, 2009, p.783). El mediastino testicular, que se ubica en el centro de los testículos, da origen a dos lóbulos incompletos que contienen los túbulos seminíferos a su vez contienen varias células como las de Sertolí que son indispensables en la espermatogénesis (Sisson, 1982, p.1732) Para que se dé la espermatogénesis se requiere que los testículos estén de 2 a 3 °C más bajos que la temperatura del cuerpo normal. Esto no sucede en la producción hormonal, esta si se puede desarrollar a dicha temperatura. En casos como la criptorquidea o una fiebre prolongada no se producirán espermatozoides (Ross, 2009, p.785).

El epidídimo, es una estructura larga que va a lo largo de la parte dorsal en la superficie lateral del testículo (Sisson, 1982, p.1732). El cordón espermático, está formado por: arteria testicular, venas, vasos linfáticos que acompañan las venas, plexo testicular nervioso, conductos deferentes, tejido muscular liso antes conocido como cremaster interno y capa visceral de la túnica albugínea (Sisson, 1982, pp.1732-1733).

Los conductos deferentes son la continuación de la cola del epidídimo que en el canino en particular tienen una ampolla estrecha (Sisson, 1982, p.1733).

Las glándulas vesiculares a diferencia del humano en el canino no se encuentran (Sisson, 1982, p.1733).

La próstata en el canino se presenta de un tamaño considerable a diferencia de los testículos que se los considera relativamente pequeños, esta es relativamente grande con estructura densa y de color amarillento (Sisson, 1982, p.1735). Al igual que las glándulas vesicales, las glándulas bulbouretrales no están presentes en el canino. (Sisson, 1982, p.1735).

El pene se encuentra compuesto de raíz, cuerpo y glande. En su parte caudal se encuentran dos cuernos cavernosos los mismos que son separados por un tabique medio, así mismo, en su parte craneal consta de un hueso que en perros grandes puede llegar a medir en promedio 10 cm (Mastín napolitano).

Ventralmente presenta un surco para la uretra, dorsalmente, es convexo y, cranealmente se hace más pequeño y tiene una prolongación fibrosa curvada. Esta prolongación en animales jóvenes está compuesta por cartílago hialino que se hace fibroso con el tiempo. El glande cubre toda la longitud del pene, es cranealmente cilíndrico con un extremo puntiagudo; caudalmente presenta un alargamiento redondeado denominado bulbo del glande que están compuestos por tejido eréctil. (Sisson, 1982, p.1735-1736).

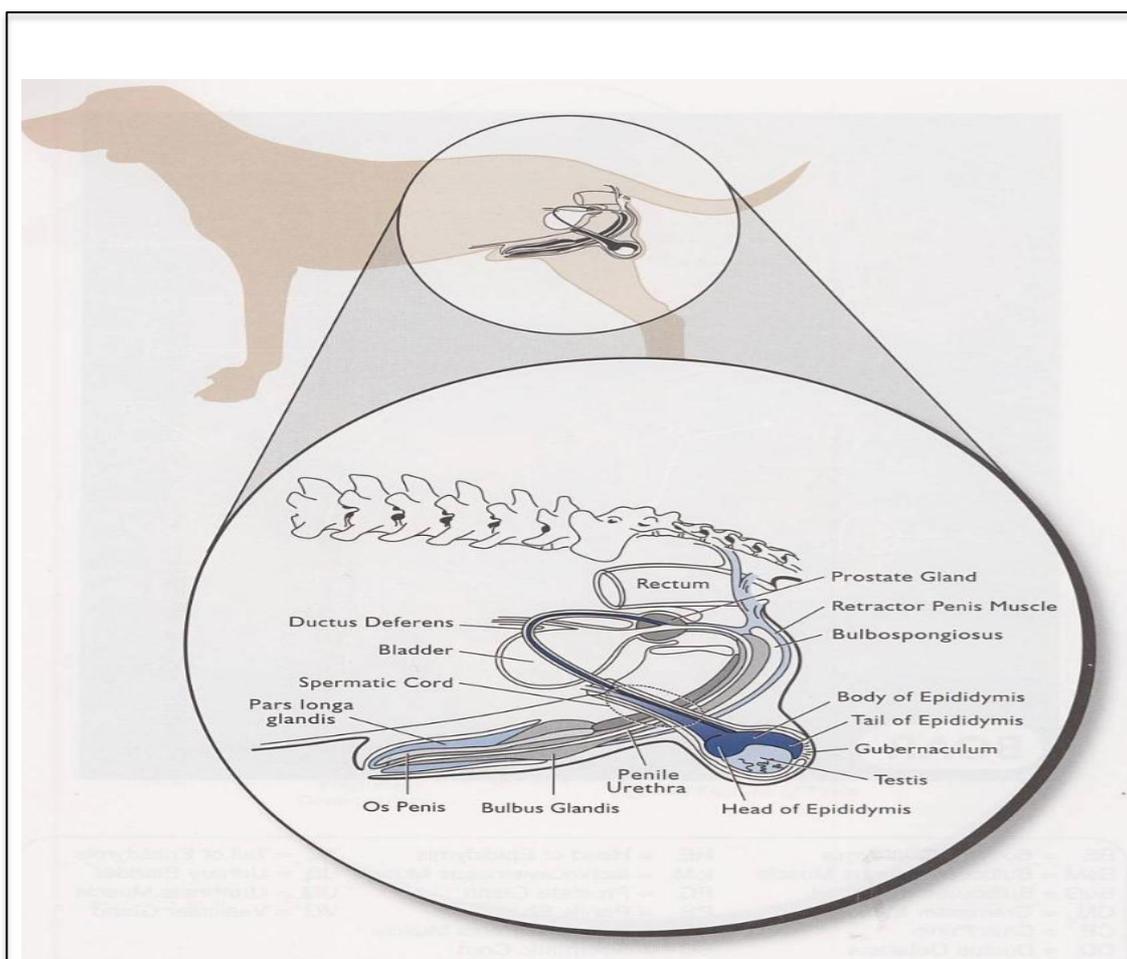


Figura 1. Características anatómicas del aparato reproductor del macho canino

Tomado de Senger, 2005, p.54

Sobre el surco del glande hacia caudal sobre el dorso del pene, pasan dos venas desde el bulbo del glande que se unen al arco isquial. De la tuberosidad isquiática de ambos lados surge el músculo isquiouretral. Estos comprimen las

venas dorsales y pueden tender a elevar el pene siendo importantes en la copulación del canino (Sisson, 1982, p.1736).

El mecanismo de erección se da por un engrosamiento del bulbo del glande y una extensión del proceso uretral provocando que el collar del glande se dilate un poco. En todos los espacios cavernosos las venas superficiales se hacen visibles y el epitelio crea una tensión produciéndose una erección (Sisson, 1982, p.1736). El glande se engrosa y alarga cuando se produce la penetración con la hembra no puede ser retirado, el macho se queda entrelazado a la hembra en un periodo de 5 a 60 minutos (Hart, 1970). El deshinchamiento ocurre primeramente en el bulbo mucho antes que el collar y la corona (Sisson, 1982, p.1736). El prepucio es una vaina que se forma alrededor del pene, es su parte craneal. Está compuesto por una gran cantidad de nódulos linfáticos y colinda con el glande. Los músculos que se encargan de la pro tracción salen de la región xifoidea y se cruzan alrededor del prepucio (Sisson, 1982, p.1736). La uretra del macho canino es grande, se extiende desde la vejiga hasta la próstata, lo cual en alargamientos patológicos de la próstata es causante de la pérdida de la micción; Un bulbo del pene bien desarrollado se encuentra en el arco isquial. Éste al mismo tiempo se encuentra dividido por un surco medio y un tabique en dos lóbulos cubiertos por el músculo bulbo-cavernoso que también ayudan a la erección (Sisson, 1982, p.1736).

### **2.3 Anatomía funcional del macho canino.**

Todos los órganos del aparato reproductor del macho canino trabajan de manera conjunta con el objetivo de producir espermatozoides para ser depositados en el tracto reproductivo de una hembra de su misma especie. Para que se cumpla este propósito, es necesario resaltar que además del trabajo genital, se necesita una interacción neuroendocrina del hipotálamo y la adenohipófisis. (Cunningham, 2009, p.518).

El escroto en conjunto con los músculos cremaster y las venas y arterias testiculares cuidan de la temperatura testicular siendo un saco de piel con una capa subcutánea de tejido muscular fibroelástico que produce una contracción

o relajación para ayudar a la termorregulación del mismo. El plexo pampiniforme, que es la red de venas y arterias ayudan a la ventilación para la termorregulación testicular. (Cunningham, 2009, p.518).

La importancia del testículo radica en las células de Leydig y en los túbulos seminíferos donde se produce andrógenos y la espermatogénesis (Cunningham, 2009, p. 518).

Hablando del funcionamiento propiamente dicho son tres porciones anatómicas del testículo las que son fundamentales: La primera, es el tejido intersticial que contiene las células de Leydig, rodea los túbulos seminíferos y los baña con líquido rico en testosterona. La segunda, es el compartimiento basal que contiene las espermatogonias que se dividen por mitosis, así como el compartimiento adluminal, donde los espermatocitos realizan las divisiones meióticas para ser espermatides y por último espermatozoide. Para impedir el paso de sangre y líquido intersticial al compartimiento adluminal, está la barrera hematotesticular que está en las estrechas uniones de las células de Sertolí separando estos dos compartimientos. En el canino, así como en todos los mamíferos domésticos, la correcta función testicular sucede en presencia de una temperatura menor a la corporal, así se puede producir la espermatogénesis. Es por esta razón que los testículos del macho canino se encuentran fuera de la cavidad abdominal, en el escroto. La criptorquidia bilateral ya antes mencionada producirá esterilidad total así como producción de andrógenos pero no de espermatozoides (no se da espermatogénesis), los testículos presentan mayor susceptibilidad a una torsión del cordón espermático y 10 veces más probabilidad de neoplasias testiculares. La criptorquidia podría tener base genética pero no hay confirmaciones aparentes de esto es más común en caninos. En el perro los testículos normalmente descienden a los cinco días después del nacimiento, no es frecuente sobre las 14 semanas de nacido y pasando los seis meses no se produce. Los túbulos seminíferos se vacían en la red testicular que lleva los espermatozoides al epidídimo, aquí los espermatozoides van a concentrarse, maduran y adquieren la capacidad de fecundación. El epidídimo es un conducto sinuoso largo que

costa de cola, cabeza y cuerpo. Los espermatozoides que se encuentran en la cabeza del epidídimo son inmóviles e inviábiles solo adquiriendo un estado maduro y estado de fecundación con la migración a través del cuerpo del epidídimo para ser maduros, motiles y viables en la cola, la maduración se da en esta migración. Por esta razón la cola del epidídimo y el conducto deferente son las reservas extra gonadales de espermatozoides. La eyaculación no altera el tiempo de migración de los espermatozoides que tiene un aproximado en especies domesticas de 2 a 5 días mientras que la duración en la cola va de 3 a 13 días pudiendo reducirse en varios días en animales sexualmente activos así como aumentándose en animales en reposo (sexual) de 7 a 10 días en promedio tomando en cuenta que el 25% de la reserva del epidídimo se pierde en eyaculaciones diarias. A través de los anillos inguinales los conductos deferentes uniendo la cola del epidídimo con la porción pélvica de la uretra. Las glándulas accesorias añaden volumen, nutrientes pero también algunas sustancias que no se conoce su función. El canino no tiene vesículas seminales ni glándulas bulbouretrales pero si una glándula prostática de gran tamaño, tiene una buena integridad indica relación directa a un buen reproductor canino. Quien se encarga de la copulación es el pene del macho, la erección es un proceso psicossomático producido simultáneamente con acciones vasculares, endocrinas y neurológicas. Para la contracción del musculo isquicavernoso produciéndose una oclusión del retorno venoso, el sistema parasimpático relajan los cuerpos cavernoso y esponjoso aumentando el tamaño y turgencia del. Cuando se habla de emisión de espermatozoides se refiere a la liberación de espermatozoides y fluidos mientras que hablar de eyaculación, es una expulsión enérgica desde la uretra. La emisión se produce por el reflejo toracolumbar medido por el sistema simpático induciendo a la contracción del musculo liso en el conducto deferente mientras que la eyaculación se da por un reflejo para simpático sacro de tal manera que hay contracciones rítmicas de de los músculos bulbo esponjoso, isquicavernoso y uretral. Cuando ya ha ocurrido la eyaculación por un relejo sacro simpático produce un incremento en la salida de sangre aumenta el tono del musculo liso

de los cuerpos cavernosos por lo que el músculo retractor del pene lo retrae hasta el prepucio (Cunningham, 2009, pp.518-519).

### **2.3.1 Espermatogénesis.**

Se denomina espermatogénesis cuando los espermatogonios dan origen a los espermatozoides. El origen de la espermatogénesis se da un poco antes de que comience la pubertad debido a mayores concentraciones de gonadotropinas hipofisarias (Ross, 2009, p.789).

La espermatogénesis se divide en tres fases, que son:

Fase espermatogónica (mitosis), se da cuando los espermatozoides realizan el proceso mitótico y dar paso a los espermatocitos primarios. (Ross, 2009, p.789).

Fase espermática (meiosis), mediante el proceso meiótico los espermatocitos primarios reducen la cantidad tanto de cromosomas como de ADN (Acido desoxido ribonucleico), desarrollándose espermátides que son células haploides. (Ross 2009, p.790).

Fase de espermátide (espermiogénesis), las espermátides pasan a ser espermatozoides maduros. (Ross, 2009, p.790).

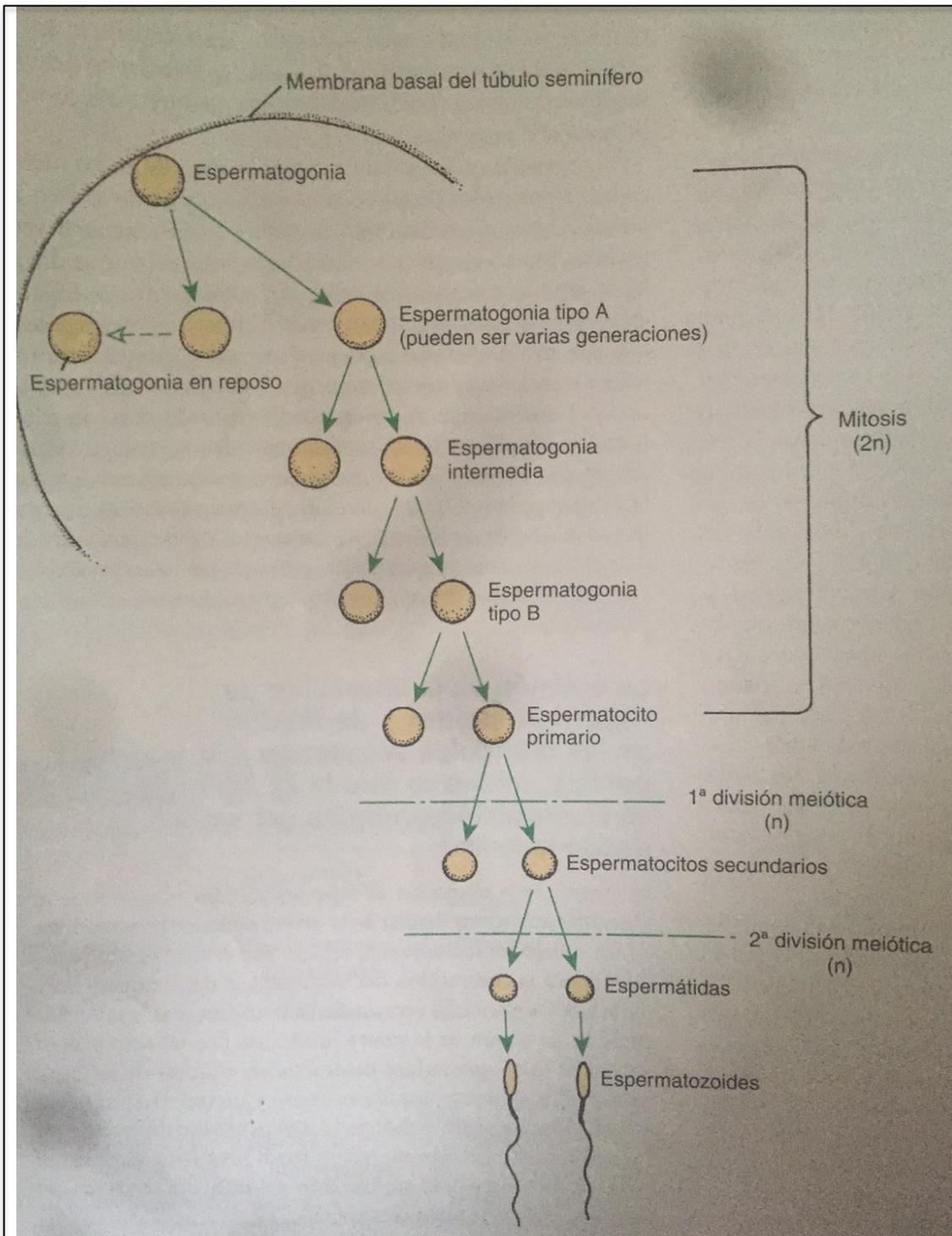


Figura 2. Proceso de espermatogénesis

Tomado de Cunningham, 2009, p.54

### 2.3.2 Eje hipotálamo- hipofisario- testicular

El hipotálamo es el encargado regula el aparato reproductor del macho, esta vinculado hormonalmente a la adenohipófisis y testículos por la LH ( hormona luteínica) y a la FSH (hormona folículo estimulante) (Cunningham, 2009, p.523) y (Senger, 2005, p.104).

Los testículos, el lóbulo anterior de la hipófisis y el hipotálamo regulan el aparato reproductor del macho y sus procesos de retroalimentación. En el hipotálamo se produce y secreta la hormona GnRH (gonadoliberina), la GnRH actúa sobre las células gonadotropicas de la adenohipófisis y estas a su vez producen y secretan las dos gonadotropinas: La FSH y (Cunningham, 2009, p.523) y (Senger, 2005, p.104).

En el testículo la LH actúa en los receptores de membrana de las células de Leydig para que se produzca la conversión de colesterol a testosterona, luego la testosterona pasa a la sangre y linfa para mediante las ABP (proteínas transportadoras de andrógenos), producidas en las células de Sertolí, actúen en procesos de espermatogénesis y transporte de células espermáticas (Cunningham, 2009, p.523) y (Senger, 2005, p.104).

La FSH actúa en los receptores de las células de Sertolí, conjuntamente con la testosterona estimulan producción y secreción de ABP, inhibina, transferina, estrógenos, entre otros. La inhibina con la testosterona interactúan en el proceso de retroalimentación de la hipófisis. La inhibina y los esteroides gonadales suprimen la producción de FSH. La liberación de LH esta regulada por la retroalimentación negativa ejercida en el hipotálamo por los estrógenos testosterona y dihidrotestosterona (Cunningham, 2009, p.523) y (Senger, 2005, p.104).

La FSH y la LH son indispensables en altas cantidades para que se produzcan los procesos de espermatogénesis como esta explicado anteriormente por lo que la administración de testosterona o inhibina para aumentar la fertilidad puede ser contraproducente al objetivo. La falta de FSH o LH impediría la

síntesis de factores responsables del mantenimiento del espermatozoide (Cunningham, 2009, p.523) y (Senger, 2005, p.104).

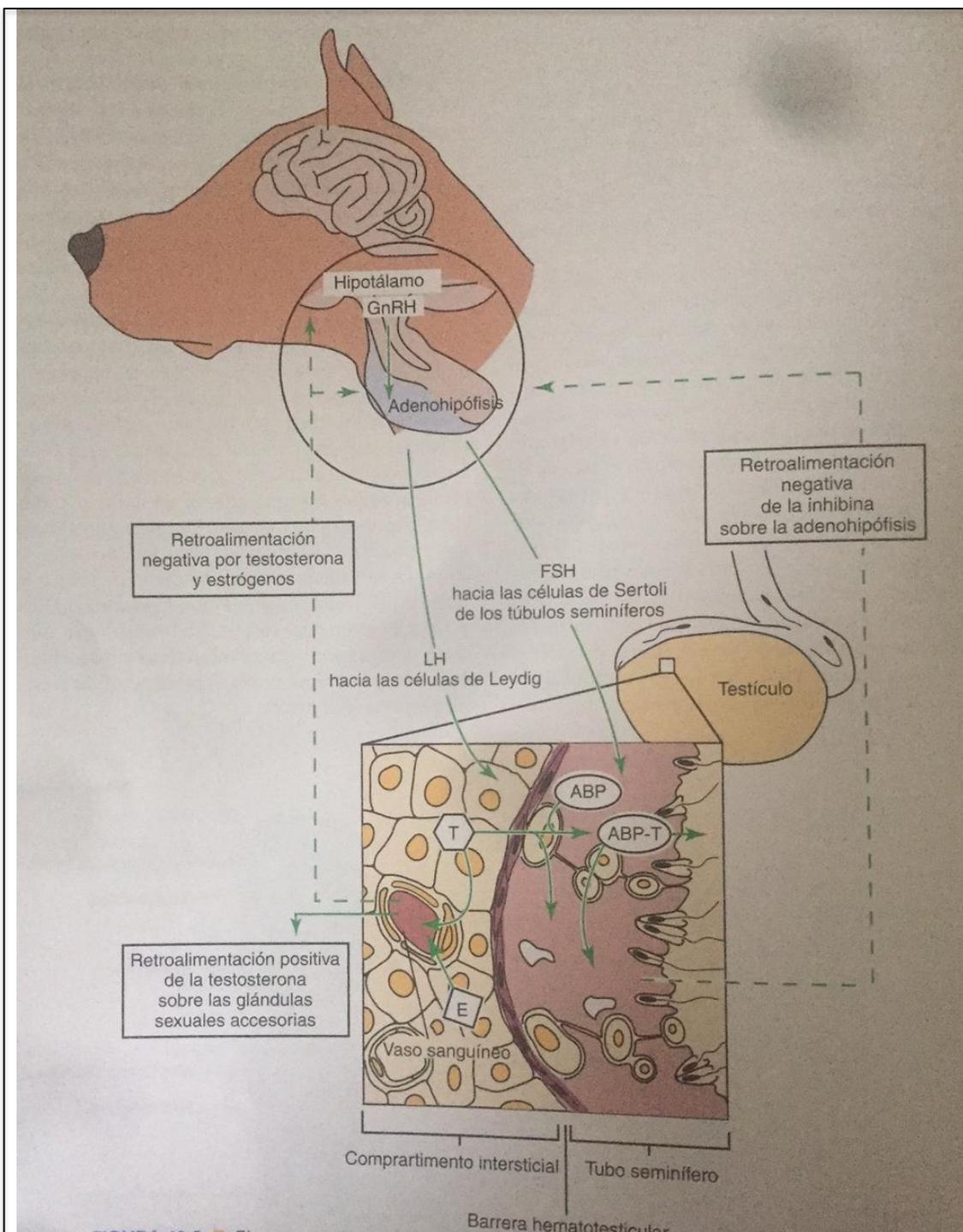


Figura 3. Eje hipotálamo hipofisario testicular

Tomado de Cunningham, 2009, p.54

#### **2.4 Recolección de semen canino.**

Para la recolección de semen se aplica un masaje en la región caudal del bulbo del glande, recaudándose el semen en un cono de recolección seminal o más rústicamente en una funda que rodee en pene del animal. El propósito para la recolección seminal usando plásticos específicos de colores es que estos solo se usaran para el procedimiento por lo que no corren el riesgo de contaminarse con otros químicos o sustancias que pueden ser tóxicos para los espermatozoides. El proceso de recolección seminal canina se lo realiza de forma manual de tal manera que la mano enguantada con un guante no espermicida ingrese por la parte posterior entre los miembros posteriores del animal hacia la parte caudal del bulbo del glande, la estimulación se lleva manualmente a través del prepucio. Existirá una semierección y la vaina prepucial se deslizará hacia atrás liberando el bulbo del glande el pene se dará la vuelta de igual forma que cuando el canino establece un contacto de colas en el acto sexual. Un beneficio de este método es la facilidad para evaluación de abrasiones, heridas, signos de inflamación, TVT (tumores venéreo transmisibles), entre otros. Cuando el perro es renuente a la eyaculación se puede aplicar el dedo pulgar en la fosa del glande a presión pulsátil del proceso uretral contra la pared de la vejiga, esta estimulación simula la del tubérculo caudal del pliegue dorsal vaginal de la hembra en el acto sexual natural. La perra no es necesaria pero puede provocar un mayor número de espermatozoides en el eyaculado. (Wanke, 2006, p.176-177).

Se debe considerar que anatómicamente:

- Dentro del prepucio del animal se encuentra el pene.
- El pene del canino está formado por el glande distal, una parte anterior larga la cual contiene el hueso peneano y el bulbo del glande.
- El bulbo del glande triplica su tamaño cuando esta erecto.
- Rodeando la uretra por el cuello de la vejiga la próstata aporta la mayor parte de líquido vesical en la eyaculación a diferencia por carencia de órganos accesorios. (Root, 2012, p. 21)

#### **2.4.1 Consideraciones previas del procedimiento.**

- El golpe de frío en el semen canino no es tan importante como en otras especies.
- El semen se puede coleccionar en cualquier recipiente limpio, pudiendo usarse vaginas artificiales de látex o polipropileno con un tubo de centrifuga en un extremo donde caerá el semen recolectado. Así mismo existen conos de recolección de polipropileno. Esta última pone presión en forma de circunferencia en el pene canino asemejándose a la acción real del perro siendo mucho mejor para la recolección seminal con ventajas de poca pérdida y contaminación de semen. (el operador rodea ajustadamente el eje del pene entre el bulbo del glande y la pared del cuerpo con los dedos así se simula la traba copulatoria o unión).
- Se debe usar un lugar rutinario para realizar la extracción así como la presencia de una perra preferiblemente en estro . (Root, 2012, p. 21)

#### **2.4.2 Procedimiento.**

- Si se cuenta con una perra para el procedimiento es necesario que para la contención de la misma cuente con un bozal y sus miembros posteriores estén firmes haciendo contacto con el suelo. En la presentación del macho este puede lamer su vulva y montarla sin problema. (Root, 2012, p. 21)
- Se masajea mediante el prepucio el bulbo del grande en repetidas ocasiones con fuerza y energía.( la erección se llevara a cabo). (Root, 2012, p. 21)
- Cuando la erección ya haya comenzado se usa la mano que sostiene el prepucio la cual presionará la parte caudal del bulbo del glande para después relajar secuencialmente el pene fuera del prepucio, la otra mano sostendrá el cono recolector para empujar la piel del prepucio proximal al bulbo del glande el cual se hinchara. (el pene del canino no se debe poner erecto dentro del prepucio, siendo esto doloroso para algunos caninos) (Root, 2012, p. 21)

- Se rodeará el pene del perro con el cono recolector de manera proximal al bulbo del glande. ( No se deberá bloquear con la mano la eyaculación) (Root, 2012, p. 21)
- El canino realizara tres fracciones de eyaculado las mismas que son: La primera es de origen prostático de volumen pequeño y color transparente pareciéndose cuando el perro empuja con vigor. La segunda fracción se produce cuando se acaba el vigor o en el final del mismo, esta fracción es rica en espermatozoides y de color blanco, el perro en esta eyaculación intentara levantar la pata para formar una unión después de la acometida por lo que el operador debe tomar la pata para mover el pene en un plano horizontal así dirigirlo caudalmente. La tercera fracción también es de origen prostático como la primera pero viene acompañada de pulsaciones que se sentirán en la mano que sostiene el cono recolector así mismo como a la vista a la altura del ano. (Root, 2012, p. 21)

#### **2.4.3 Cuidados posteriores y complicaciones.**

- Perros presentan vasos en la superficie del pene cuando se lleva a cabo la erección completa no siendo peligroso para el animal ni tampoco un problema resistente. (Root, 2012, pp. 21-23)
- A veces se presentará una erección prolongada con secreción de líquido seminal ( para calmar la detumescencia se debe entre otras cosas; apartar a la perra en celo, aplicar compresas con paños fríos en la zona del pene o hidroterapia, alimentarlo, esperar un poco de tiempo. Para que el perro pueda regresar a su actividad normal debe producirse completamente la detumescencia. (Root, 2012, pp. 21-23)

## **2.5 Evaluación seminal**

### **2.5.1 Consideraciones previas del procedimiento.**

El golpe de frío no es un problema como pasa en otras especies, para lo cual el equipo y las muestras para la evaluación pueden mantenerse a temperatura ambiente. (Root, 2012, p. 24).

### **2.5.2 Procedimiento**

#### Color

Se evalúa de forma visual siendo el semen normal de color blanco lechoso. Mientras que los colores anormales serían: Verde (infección), rojo (trauma penéneo o enfermedad prostática), marrón (sangre antigua por enfermedad prostática), amarillo (contaminación con orina), Transparente (no existen espermatozoides). (Root, 2012, p. 24)

#### Volumen

No existe una relación de volumen con la calidad espermática ya que dependerá de cuánto de la primera y tercera fracción recolectó el operador. Es importante registrar la cantidad recolectada para calcular la cantidad de espermatozoides en la eyaculación. (Root, 2012, p. 24)

#### Motilidad

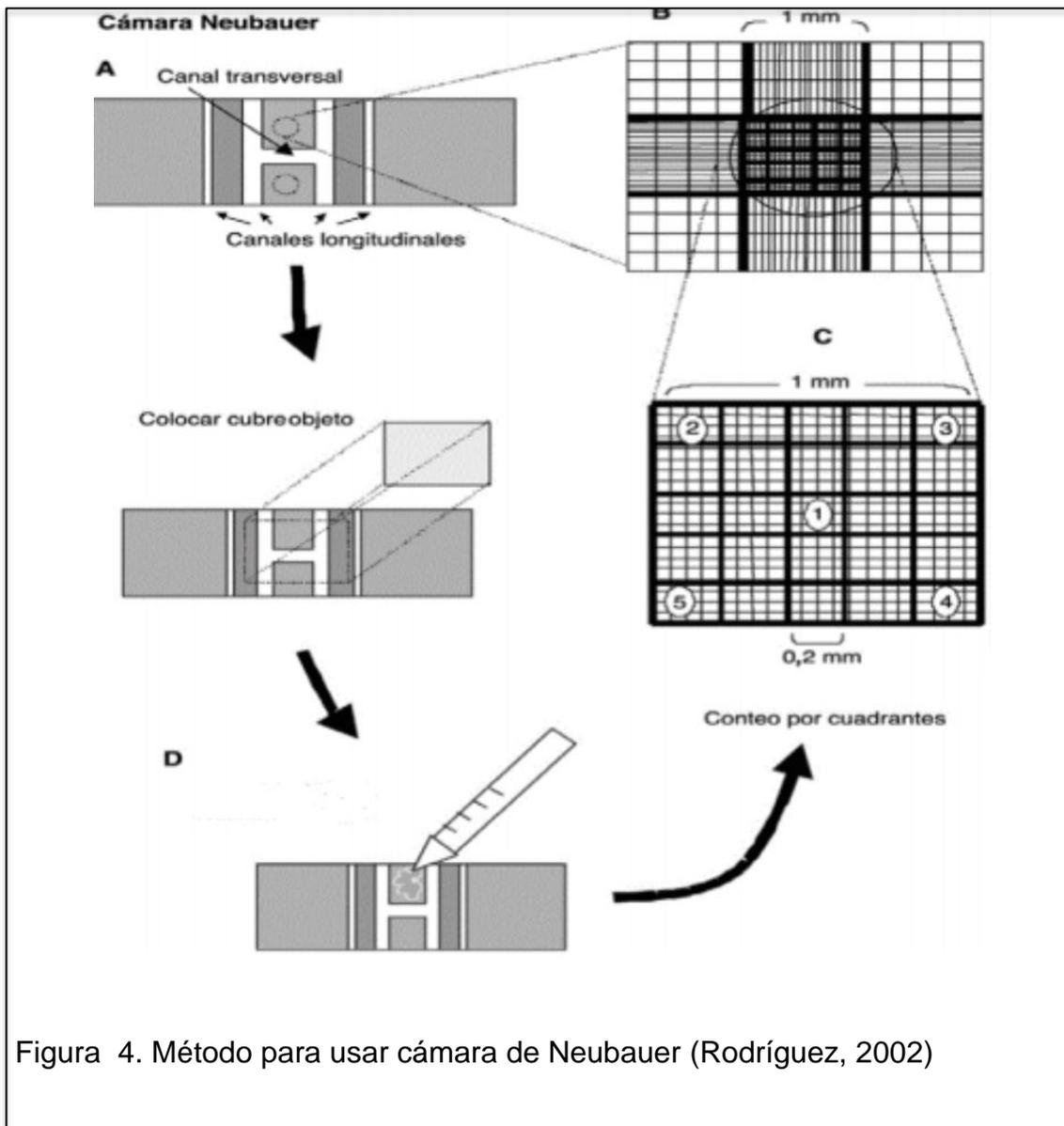
La motilidad se evalúa apenas se recolecta el semen del canino, colocando una gota en el portaobjetos del microscopio, normalmente se deberían mover el 70% de los espermatozoides hacia adelante. También se evalúa la velocidad de los espermatozoides pero no se ha demostrado una correlación entre la velocidad de los espermatozoides y la fertilidad del perro. (Root, 2012, p. 24)

#### Concentración o cantidad total

La concentración espermática se calcula con la relación de espermatozoides por ml multiplicado con el volumen total en ml. El volumen total espermático en el canino dependerá siempre del líquido prostático con mayor abundancia en la especie por lo que la concentración de espermatozoides en canino no suele ser muy precisa (Felman, et. Al, 2004, p.53)

Se realiza mediante una dilución de 1:100 con SF (solución salina amortiguada con formalina). De tal manera que un 0,1 ml de semen canino se diluyen en 0,9 de SF, así mismo de esta solución se vuelve a diluir 1ml en 9ml de SF.

Los espermatozoides se cuentan usando una CNB (cámara de Neubauer) de tal manera que en un cubre objetos se coloca la muestra de semen a colocarse en el área central de la CNB, la acción capilar lo hará trasladarse al centro llenando cada lado de la CNB por separado, se dejara asentarse durante cinco minutos después de llenarlo así los espermatozoides se precipitaran. (Root, 2012, p. 24-25). Si bien la CNB contiene nueve cuadrados con el aumento de 10X se verá solamente un cuadrado llenando el campo del microscopio. Todos los espermatozoides encontrados multiplicados por  $10^6$  y después se multiplica por el volumen de la extracción, proporcionaran la concentración espermática en millones por mililitro a rangos de 200 a 2000 millones. (Root, 2012, p. 24-25) y (Felman, et. Al, 2004, p.53).



Existen otras técnicas más rápidas para la evaluación cuantitativa de espermatozoides incluyendo sistemas asistidos por computadora pero esta es la técnica con menos errores demostrando siempre mayor precisión. (Root, 2012, p. 24-25)

Si el operador colectó semen con más líquido prostático la muestra estará más diluida de tal manera que se obtendrá una concentración espermática baja. Pero para obtener una relación se debe multiplicar el volumen colectado por la concentración de espermatozoides por mililitro de tal manera que el resultado será espermatozoides por eyaculación el rango varía según el tamaño del

animal pero normalmente se encuentra entre 300 millones a 2000 millones. (Root, 2012, p. 24-25).

### Morfología

En el canino la morfología del espermatozoide no está relacionada con la fertilidad como en otras especies, pero si se asocia con una mala motilidad. Por lo tanto, está asociada con la correlación de los espermatozoides a llegue a las trompas uterinas y fertilice a los óvulos. Algunos estudios determinan una correlación en anormalidades de la cabeza del espermatozoide con el grado de desnaturalización del ADN dentro de la célula. (Root, 2012, p. 25-26).

Se coloca una gota de semen en un extremo de un portaobjetos para hacer TINCIÓN TRIPLE (fijador, safranina y cristal violeta) secándose durante cinco minutos en cada una de las tres tinciones, después se enjuaga y se evalúa en aceite de inmersión. (Root, 2012, p. 25-26).

También se puede añadir una gota de semen en el extremo de un portaobjetos con una gota de tinción de eosina-nigrosina al mismo tiempo, con otro portaobjetos se ayuda a mezclarlas y luego se esparcen para luego secar y evaluar en aceite inmersión. (Root, 2012, p. 25-26).

Morfológicamente hablado los espermatozoides pueden tener dos tipos de problemas: Defectos primarios.- los cuales se producen desde la espermatogénesis pudiendo ser cualquier cosa duplicada, gotas citoplasmáticas proximales, anormalidades de la cabeza y curvatura en la parte central. Defectos secundarios.- se producen en la preparación de las muestras o indican la presencia de una infección, se ven gotas citoplasmáticas distales, colas curvadas y cabezas desprendidas. Se desconoce que defectos (primarios o secundarios) tendría mayor importancia en la fertilidad, pero por la forma de tratar se entiende que defectos primarios serían un agravante en la fertilidad del animal. (Root, 2012, p. 25-26).

### **2.5.3 Parámetros normales del semen.**

Además de los análisis mencionados anteriormente en el seme se pueden evaluar pH y concentración de FA (fosfatasa alcalina) en el líquido seminal. (Root, 2012, p.56)

Los defectos secundarios se producen durante el almacenamiento en el epidídimo o en el proceso de colección y tratamiento. (Root, 2012, p.56).

En caninos existe un amplio rango del número de espermatozoides esto debido a el mismo margen de amplitud en relación a las dimensiones de los testículos. Para que una perra se preñe se estima que se necesitan 250 millones de espermatozoides si el perro tiene 500 millones y la mitad son viables estará bien pero si solo un 10% son viables deberá usarse 5 inseminaciones para tener la misma probabilidad inicial. (Root, 2012, p.56-57).

En el epidídimo así como en los testículos se origina la FA por lo que se encuentra presente en el líquido seminal. La FA se evalúa en muestras de líquido seminal que no contienen espermatozoides. Cuando se encuentran valores bajos de FA daría a entender que no se recuperó el líquido del tracto reproductivo que hay una obstrucción con presencia del dolor que impide el eyaculado un valor mayor a 5000 UI /l indica que se recuperó líquido del tracto reproductivo y no se está produciendo espermatogénesis. (Root, 2012, p.56-57).

### **2.5.4 Pruebas varias.**

Se puede realizar también citología y cultivo celular del esperma canina. Debido a que el semen canino se encuentra diluido la citología es un examen difícil. Se debe centrifugar la muestra y analizar la presencia de células inflamatorias, epiteliales, bacterias, entre otros. Para el cultivo se debe considerar que la recolección seminal no es un proceso estéril considerando a  $10^5$  bacterias/ml o más significativo. (Root, 2012, p. 26-27).

Una prueba para validar la integridad de la membrana plasmática es la hinchazón hipoosmótica, de tal manera que se colocarán espermatozoides en un medio hipoosmótico si no al daño en la membrana plasmática los espermatozoides son normales y viables. El Líquido deja las membranas plasmáticas intactas y la cola de los espermatozoides se riza. Se coloca 10 UI de semen en 100 UI de solución sacarosa de 100 mM evaluando después de un minuto. (Root, 2012, p. 26-27).

### **2.5.5 Sistemas Automatizados.**

Los sistemas CASA (Computer Assisted Semen Análisis o sistemas de análisis espermático asistido por computadora) son generalmente usados cuando se tiene cargas de congelación seminal muy grandes. Se debe calibrar la máquina para semen canino considerando que el semen canino es mucho más diluido que en otras especies. (Root, 2012, p. 26-27).

## **2.6 Congelación de semen**

### **2.6.1 Consideraciones.**

Todos los machos que se usen para la reproducción caninas deberían estar libres de enfermedades hereditarias e infecciosas. Los machos caninos que van a ser usados para congelar semen deben ser negativos en brucelosis canina mientras que las enfermedades hereditarias a ser identificadas varían según la raza. Como requisitos para el trabajo internacional se debe certificar con OFA (Fundación ortopédica para animales), programa de mejoramiento de la cadera de la Universidad de Pennsylvania y la fundación de registro ocular canino. Otra consideración importante es que si se quiere registrar a los cachorros obtenidos con semen congelado en la AKC (American Kennel Club) el macho dueño del semen debe estar registrado con su ADN en el mismo siguiendo especificaciones indicadas por los mismos. El semen colectado antes

del 1ro de octubre de 1998 no necesita este requisito en la AKC. (Root, 2012, p. 36).

La viabilidad de los espermatozoides caninos después de la congelación y descongelación disminuye por deshidratación, cambios osmóticos, formación de cristales de hielo, reacciones químicas inducidas del proceso, daños físicos de los espermatozoides por lo que es recomendable la inseminación directa en el útero las tasas de concepción son 95% intrauterina, 70% transcervical y 45% en vaginal. (Root, 2012, p. 36).

El semen canino congelado es básicamente espermatozoides eyaculados en un diluyente el cual contiene un crioprotector además de antimicrobianos soluciones amortiguadoras y nutrientes. Los crioprotectores mas comunes son la yema de huevo y el glicerol pudiendo usarse leche en países que tienen problemas con la gripe aviar. En el mundo existen algunos bancos de esperma canina como Synbiotic, CLONE, ICSB (international Canine Semen Bank) el último cuenta con un protocolo propio para la ejecución del procedimiento. (Root, 2012, p. 36-37).

Es importante decir que como se pierde viabilidad en el proceso de congelación y descongelación es recomendable solo congelar cuando se tiene una buena calidad de semen. (Root, 2012, p. 36-37).

No se registran estándares industriales para la congelación de semen canino. (Root, 2012, p. 36-37).

Para realizar el procesamiento se procede a la extracción seminal, inmediatamente analizar el semen recolectado se puede encontrar varias gotas citoplasmáticas proximales las cuales están relacionadas con infertilidad y baja supervivencia espermática al congelar y descongelar. (Root, 2012, p. 36-37).

Si una muestra seminal tiene 40% o más de hemoderivados no es recomendable la congelación ya que la hemoglobina que es liberada por hemolisis causa una baja viabilidad. (Root, 2012, p. 36-37).

Cuando se tiene hemoderivados y muchos espermatozoides con anormalidades se puede usar un proceso en el cual mediante un gradiente se filtren solo espermatozoides buenos sin hemoderivados para después centrifugarse y así precautelar los espermatozoides buenos. (Root, 2012, p. 36-37).

### **2.6.2 Procesamiento.**

Una vez obtenido el semen se deberá determinar la cantidad de espermatozoides obtenidos además de identificar números de registro y datos del canino. (Root, 2012, p. 36-37).

Centrifugar por cinco minutos usando g (gravidades) para sedimentación urinaria (500g a 700g), se extrae una gota de sobrenadante si hay todavía muchos espermatozoides se volverá a centrifugar durante otro cinco minutos el sobrenadante. El pellet de espermatozoides de debe agregar al diluyente en porciones de 1:2 o 1:4 a temperatura ambiente. Se refrigerara (4 °C) durante una hora para después agregar el segundo diluyente que debe contener glicerol en cuatro alícuotas iguales durante 45 minutos para tener una concentración de glicerol al 4%. Se coloca el semen en las pajuelas a temperatura de refrigeración durante 90 minutos la pajuelas deben tener una burbuja de aire para evitar derrame de semen posterior. Las pajuelas se van a exponer a 13 centímetros del LN2 (Nitrógeno líquido) durante cinco a diez minutos, después deberán sumergirse en LN2 y posteriormente pasar al tanque con LN2 a una temperatura de -195,8°C. (Root, 2012, p. 36-37).

### **2.6.3 Complicaciones de congelación seminal en caninos.**

Algunos caninos no toleran el proceso de congelación seminal de tal manera que podrían tener una enfermedad subclínica o su semen no es compactible con el diluyente por lo que en es recomendable en cualquier proceso de congelación descongelar inmediatamente para una evaluación. (Root, 2012, p.37).

Los animales que no mantienen una calidad seminal en el proceso de congelación pueden tener un problema genético y por buen ejemplar que sea sería inútil el proceso de congelación, a lo que se debería tener en cuenta de la imposibilidad del proceso. (Root, 2012, p.37).

El semen congelado debe mantener su temperatura en todo momento, algunos sistemas de transporte no permite el LN2 por lo que se puede usar sistemas de embalaje con vapor de nitrógeno, el cual tiene una duración de tres semanas. (Root, 2012, p.37).

## **2.7 Crio protector y diluyente de semen canino**

### **2.7.1 Interacción de células y crio preservación**

En la crio preservación de semen canino las células espermáticas durante los procesos de congelación sufren daños en un medio hiperosmótico presentando una contracción celular y muerte, el crio protector recupera su forma y tamaño. De igual manera que en la congelación, en el proceso de enfriamiento el espacio intercelular se forman cristales de hielo. Según la tasa de enfriamiento los cristales pueden pasar de la membrana celular y dañar las células espermáticas por una semi permeabilidad y muerte celular posterior. En la descongelación el volumen de agua en la célula varía, citando diferentes tiempos para descongelar con rangos de 30 segundos a 1 minuto a 37 °C (Bohorquez, 2005) y (Soares, et al. 2003).

Todas las razas de caninos presentan morfología y motilidad similar en las células espermáticas sin embargo se citan diferencias en la estructura de la membrana celular con interacciones de mejor permeabilidad, intercambio de agua y formación de cristales por lo que para estudios experimentales se debería usar una misma raza a ser evaluada (Soares, et al. 2003).

### **2.7.2 Crio protectores de semen canino**

Un crio protector es un soluto que ayuda a la célula a sobrevivir un proceso de enfriamiento extremo, sin embargo pese a ser moléculas neutrales los crio protectores presentan un grado de citotoxicidad en relación a la temperatura y tiempo de exposición con la células espermáticas (Stornelli et al. 2006). La yema de huevo representa a los crio protectores no permanentes, su función es recubrir a la membrana de las células espermáticas sirviendo como un buffer osmótico y así intervenir en los procesos de deshidratación e hidratación celular estabilizando las células espermáticas, no atraviesa la membrana de las mismas (Rodríguez, et al. 2002). El uso de DMSO (dimetil sulfoxido) y OEP (Orvus Es Paste) los cuales permanecen en la membrana de las células espermáticas, favoreciendo un intercambio de agua normal en la célula durante los procesos de congelado y refrigerado (Stornelliet al. 2006).

El glicerol es el crio protector más utilizado en la congelación de semen con características de baja toxicidad, de tipo permanente, ayudando a la membrana celular en la permeabilidad y fluidez pero presenta un peso molecular elevado, esto hace un lento accionar sobre las células espermáticas (Silva, et al. 2003). Sin lugar a dudas el crio protector evitará las lesiones celulares en procesos de congelamiento y descongelamiento, pero la adición y remoción durante la congelación y descongelación puede dañar al espermatozoide (Stornelliet al. 2006).

### **2.7.3 Diluyentes de semen canino**

Un diluyente en la crio preservación seminal es un grupo de compuestos que permiten la supervivencia celular en procesos de refrigerado, congelación y descongelación, estabilizan la membrana celular y simulan características fisiológicas de fluidos orgánicos. Con la adición de crio protectores se controla la osmolaridad para evitar la deshidratación celular (Soares, et al. 2003). Por lo general los diluyentes contienen algunos buffer de: pH como citrato de sodio,

osmótico como hepes, energético con glucosa o fructosa, antibiótico como penicilina o estreptomicina y un medio excipiente como Tris o TALP (Tyrodes Albumin Lactate Piruvate) (Rodriguez, et al. 2002).

### **3. CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS.**

#### **3.1 Materiales:**

##### **3.1.1 Materiales biológicos:**

- Perro (machos)
- Secreciones vaginales (feromonas)

##### **3.1.2 Materiales de laboratorio y equipos:**

Guantes de recolección no espermicidas, bolsas plásticas para recolección seminal, CNB (cámara de Neubauer), porta objetos, cubre objetos, microscopio, tanque baño maría, centrifuga lenta, tiras de pH, tubos de centrifuga, pajuelas de 0,25ml, tanque de LN2, cooler espuma flex, rejilla metálica, catéteres, pipeta, jeringas 3ml.

##### **3.1.3 Ingredientes para las diluciones y diluciones crio protectoras registradas:**

Tris, ácido cítrico (monohidratado), fructosa, agua destilada, glicerol, penicilina, tilosina, espectinomicina, lincomicina, gentamicina, DHS, yema de huevo, azúcar tampones, glicerina.

#### **3.2 Metodología.**

##### **3.2.1. Ubicación geográfica del experimento:**

El aprendizaje y práctica de la técnica (método noruego) se desarrolló en México en las ciudades de México Distrito Federal y Estado de México.

La colecta de semen de los ejemplares utilizados y el proceso experimental de dilución y post congelación objeto del estudio, se realizó en el Ecuador región sierra centro.

Tabla1. Ubicación geográfica y características de la zona en estudio

Provincia	Cantón	Parroquia	Altitud	Latitud	Longitud
Pichincha	Latacunga	Mulaló	3100 m	0.616667S	78.5667W

### 3.2.2 Características de la unidad experimental:

La unidad experimental estuvo constituida por un canino macho *Canislupus familiaris* de raza *Mastín napolitano* que cumpla con los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

Tabla 2. Criterios de inclusión y exclusión de los animales en estudio.

<b>Criterios de inclusión</b>
Macho canino
Edad 2 a 5 años de edad
Optimo estado de salud
Análisis espermático en los rangos normales de referencia del canino tabla 3
<b>Criterios de exclusión</b>
Enfermedades en el aparato reproductivas como brucelosis, postatitis, entre otras.
Problemas reproductivos: mayor al 10% de defectos primarios

Tabla 3. Parámetros normales del semen canino (Felman, 2004).

Parámetros	Valor de referencia
Motilidad	Mayor al 70%
Concentración	Mayor a 200 millones de espermatozoides/ml
pH	6,3 a 6,7
Defectos morfológicos primarios	Menor al 10%
Defectos morfológicos secundarios	Menor al 20%
Color	Blanco lechoso
Olor	Sin olor putrefacto
Aspecto	Espeso

La población total del criadero donde se hizo el experimento, está constituida por 60 ejemplares, de los cuales son 13 machos y las hembras. De los machos del criadero, 8 ejemplares cumplen con los criterios de inclusión descritos en la tabla 2 y en la tabla 3, por lo cual fueron seleccionados para la colecta de semen requerido en el experimento.

### 3.2.3 Factores en estudio:

FE1:

Olor.- Le semen no debe contar con ningún olor putrefacto. La muestra normal es casi inodora.

Color.- el color normal del semen es blanco lechoso, pudiendo existir anomalías indicadoras de problemas descritas en el estudio.

Aspecto.- aspecto normal del semen de tonalidad densa uniforme.

Individuos para la colecta de la muestra.- perros de raza mastín napolitano que cumplan con los criterios de inclusión y exclusión.

### **3.2.4 Variables en estudio.**

Motilidad.- la motilidad evaluada en este estudio se consideró con los espermatozoides con patrones de movilidad determinado número de motiles en cada 100.

Concentración.- para la concentración espermática después de la centrifugación se contó espermatozoides en cada ml

pH.- para el parámetro de pH se usaron cintas de sensibilidad de las mismas.

Morfología.- en la morfología se determinó las anomalías primarias y secundarias encontradas en cada 100 espermatozoides para expresarlo en %

### **3.2.5 Diseño experimental.**

Para el estudio se realizó una colecta seminal a los 8 perros que cumplieron con los criterios de inclusión. Se establecieron 4 tratamientos que consisten en distintos diluyentes de semen usados para procesar las muestras colectadas y evaluar las variables en dos fases: dilución y post descongelación. Los cuatro tratamientos fueron comparados entre sí y a su vez con un tratamiento control que corresponde al semen fresco.

Este procedimiento se realizó dos veces para tener un promedio de las muestras y que los datos tengan mayor valor estadístico. Los tratamientos

como se ve en la Tabla 5. Fueron usados en las dos fases mencionadas con dos repeticiones en cada individuo con un descanso de 4 días entre cada colecta.

Tabla 4. Tratamientos usados en la experimentación.

T0	Semen fresco	No tuvo tratamiento.
T1	CaniPlus ®	Tris (Tris hidroximetil) aminometano, glicerol como un agente crio protector, gentamicina (antibiótico), fructosa, ácido cítrico, antioxidantes y agentes estabilizantes específicos.
T2	CaniPro ®	Tris, glicerol (en segunda adición), agentes estabilizadores, antibióticos.
T3	Triadyl ®	Tris, ácido cítrico, azúcar tampones, glicerina, agua de extrema pureza, tilosina 5,7 mg, gentamicina 28,6 mg espectinomocina 34,3 mg, lincomicina 17,2 mg.
T4	Noruego	Tris 6,05g, ácido cítrico (monohidratado) 3,4g, fructosa 2,5g, agua destilada 184ml, glicerol 16ml, penicilina 200,000UI, DHS 0,2g, yema de huevo 20% (v/v).

Tabla 5. Diseño experimental de tratamientos.

	T0	T1	T2	T3	T4
D		T1D			
P		T1P			

Nota: D, significa etapa de dilución y P, Post descongelación.

### **3.2.6 Manejo del experimento.**

#### **3.2.6.1 Colección de semen fresco**

Se realizó mediante la manipulación digital en el perro, usando una perra en celo para estimulación del libido del macho. Para todas las muestras se usó la segunda fracción del eyaculado.

Se aplicó masajes en el prepucio para que el bulbo peneano se agrande retrayendo el prepucio, después se giró el pene 180 grados con estímulos pulsátiles emulando una monta natural. Cuando el perro eyaculó, se colectó la segunda fracción.

Se centrifugó el semen colectado en tubos de centrífuga por cinco minutos, usando 500g a 700g para sedimentación urinaria. Se extrajo una gota de sobrenadante para evaluación de carga espermática, si todavía se observaban muchos espermatozoides se volvió a centrifugar durante otros cinco minutos el sobrenadante.

Para calcular las fuerzas g, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Fuerza g} = (R \times 11,18 \times (\text{RPM})^2) / (1000)$$

Dónde: R es el radio desde el eje de la centrífuga hasta el tubo.

#### **3.2.6.2 Preparación de los diluyentes:**

Tratamiento 1: CaniPlus®

- Se mantuvo la muestra a baño maría 35°C
- Se diluyó con Caniplus en proporciones de 1:1
- Se refrigeró por dos horas a 4°C
- Se colocó en pajuelas de 0,25ml y se sellaron con polvo PVC
- La muestra se estabilizó en vapores de nitrógeno líquido por 10 minutos a 4 cm para luego congelarse
- Se descongeló a 37°C por 60 segundos

#### Tratamiento 2: CaniPro®

- Se mantuvo la muestra a baño maría 35°C
- Se diluyó con Canipro® A en proporciones de 1:1
- Se refrigeró por dos horas a 4°C
- Se agregó Canipro® parte B del diluyente en proporciones 1:1:1
- Se colocó en pajuelas de 0,25ml y se sellaron con polvo PVC
- La muestra se estabilizó en vapores de nitrógeno por 10 minutos a 4 cm para luego congelarse
- Se descongeló a 37°C por 60 segundos

#### Tratamiento 3Triladyl®

- Se mantuvo la muestra a baño maría 35°C
- Se diluyó con Triladyl® en proporciones de 1:1
- Se refrigeró por dos horas a 4°C
- Se añadió yema de huevo
- Se añadió agua bidestilada en proporciones iguales
- Se colocó en pajuelas de 0,25ml y se sellaron con polvo PVC
- Se congeló primero 10 minutos en vapores de LN2 a 4 cm de altura para luego congelarse
- Se congeló primero 10 minutos en vapores de LN2 a 4 cm de altura para luego congelarse
- Se descongeló a 37°C por 60 segundos

#### Tratamiento 4: Método Noruego

- Se diluyó el semen congelado en proporciones 1:5 después volver a centrifugar para regresar a la proporción original.
- Se diluyó con Tris la a baño maría 35 °C enfriándose dos horas llegando a 4 °C antes se añadió yema de huevo.
- Se colocó en pajuelas de 0,25ml y se sellaron con polvo PVC

- Se congeló primero 10 minutos en vapores de LN2 a 4 cm de altura para luego congelarse
- El semen se descongeló en 8 segundos a 70 °C

### **3.2.7 Medición de las variables.**

Las diferentes variables se analizaron en la colecta seminal, en la fase de dilución y en la fase post descongelación.

Color, olor y aspecto: se evaluó de forma visual, siendo el semen normal de color blanco lechoso, mientras que los colores anormales: verde (infección), rojo (trauma peniano o enfermedad prostática), marrón (sangre antigua por enfermedad prostática), amarillo (contaminación con orina), transparente (no existen espermatozoides). (Root, 2012, p. 24).

Motilidad y concentración: los espermatozoides se contaron usando una CNB (cámara de Neubauer). Se colocó la muestra de semen en el área central de la CNB y se cubre con cubreobjetos; la acción capilar permite el traslado al centro llenando cada lado de la CNB por separado. Se dejó reposar durante cinco minutos después de llenarlo, así los espermatozoides se precipitan y se pudo realizar el conteo (Root, 2012, p. 24-25).

Con el aumento de 10X se observó solamente un cuadrado de la cámara llenando el campo del microscopio. Todos los espermatozoides encontrados en el cuadrado multiplicados por  $10^6$  por el volumen de extracción, proporcionaron la concentración espermática en millones por mililitro (Root, 2012, p. 24-25).

Morfología: se colocó una gota de semen en el extremo de un portaobjetos con una gota de tinción de eosina-nigrosina al mismo tiempo; con otro portaobjetos se mezcla al tomar contacto con la muestra y se hace frotis, luego se deja secar y se evaluó al microscopio con aceite inmersión (Root, 2012, p. 25-26).

### **3.3 Análisis estadístico.**

Para analizar la supervivencia y viabilidad espermática durante la fase de dilución y post-congelamiento, se realizó un análisis de varianza (ADEVA) de un factor con igual repetición, para analizar y describir las diferencias entre grupos en base a los resultados obtenidos (Ortega, 2008, p.71). También se realizó comparaciones de todos los grupos con T test. En el caso de que el p-valor para la variable analizada en el ADEVA fuera significativo, se estableció cuál grupo de medias difiere al efectuar una prueba de Duncan al 5% (Petrie y Watson, 2013, p. 106).

#### **4. CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

Una vez concluido el proceso experimental se analizaron los datos obtenidos de las variables en estudio, luego de la colecta seminal: control, dilución del semen y post congelación; repitiéndose en dos fases del experimento para dar más validez a los resultados a indicarse.

##### **4.1 Análisis cualitativo y cuantitativo del semen fresco.**

En el proceso de colecta seminal se evaluó características cualitativas como: color, olor y aspecto.

Todos los perros mostraron color normal (blanco lechoso) en las colectas de semen evaluadas. Solamente hubo diferencias en la coloración (rojo) para los individuos 3 y 5 en una colecta y para el individuo 4 en una colecta. Tomando en cuenta lo citado por Root (2012, p. 24), es importante determinar el color de la muestra seminal, porque puede ser indicador de algunas anomalías del semen, así por ejemplo: transparente indica carencia espermática; amarillo, contaminación con orina; marrón, sangre antigua por enfermedad prostática; rojo pudiendo ser sangre de trauma o enfermedad prostática; y verde, infección. Así mismo, algunos perros jóvenes que se someten a las primeras colectas, tienen sangrado en la superficie del pene por vasos pequeños, pero no se presenta con frecuencia en el mismo perro y no representa un problema que afecte la calidad de la muestra, porque el semen colectado se procesa (Root, 2012, p. 21).

Con respecto al olor y aspecto, no se encontró ninguna anomalía en relación a los rangos de referencia. El volumen obtenido fue normal en todos los casos, con una colecta total de 2 a 4 ml del segundo eyaculado de los caninos. Estos datos ratifican los parámetros de inclusión de los individuos como unidades experimentales.

Tanto en la primera como en la segunda colecta, se evaluaron las características cuantitativas: motilidad, concentración, pH y morfología (defectos primarios y secundarios de los espermatozoides), como ve en la Tabla 6.

Tabla 6. Características cuantitativas observadas en el semen fresco

Semen fresco (T0)								
	1	2	3	4	5	6	7	8
Volumen	2,5	4	3,15	3,25	3,5	3	3,75	3,25
Motilidad	82	85	93	90	86	85,5	82	87,5
Concentración	310	397	338	361	303	312,5	327,5	235
pH	6,75	6,75	6,65	6,15	6,3	6,85	6,4	6,7
Defectos primarios	6	5,5	14	9	5,5	14	11,5	9,5
Defectos secundarios	15	9	16	11	10	14,5	15	16,5

## 4.2 Motilidad espermática:

### 4.2.1 Motilidad en la fase dilución.

En la fase de dilución, se comparó los 4 tratamientos con el semen fresco encontrando significancia en todas las comparaciones.

Tabla 7. T test para la variable motilidad en la fase de dilución.

Motilidad en dilución T test pareado					
	T0	T1	T2	T3	T4
Media	86,375	81,3125	78,5	78,5625	82,625
Varianza	14,19642857	13,63839286	6,214285714	2,959821429	13,19642857
N	8	8	8	8	8
P(T<=t) dos colas		2E-05	0,000628678	8,61373E-05	0,042185899

En la Tabla 8 se observan los resultados del ADEVA. Debido a que el p-valor es menor a 0,05, se concluye que existe significación estadística entre grupos, lo que permite rechazar la hipótesis nula de que no existe diferencia entre ellos. Es decir los diferentes tratamientos y el semen fresco son diferentes entre si en cuanto a la variable motilidad en la fase de dilución.

Tabla 8. ADEVA para la variable motilidad en la fase de dilución.

Fuente de Variabilidad	SC	g.l.	CM	Valor p	Valor crítico para F
Total	692,98	39			
Grupos	341,54	4	85,38	0,0001	8,50
Error	351,44	35	10,04		

Al realizar la prueba de Duncan al 5% (Tabla 9) para la variable motilidad en la fase de dilución, se puede observar que se forman cuatro rangos: "A" conformado por los tratamientos 2 y 3; "B" conformado por el tratamiento 1; "C" conformado por el tratamiento 4 y "D" conformado por semen fresco.

Tabla 9. Prueba de Duncan al 5% para la variable motilidad en la fase de dilución.

Grupo	Medias	n	Rangos
Tratamiento 2	78,50	8	A
Tratamiento 3	78,56	8	
Tratamiento 1	81,31	8	B
Tratamiento 4	82,31	8	C
Semen fresco	86,38	8	D
<i>Letras distintas indican diferencias significativas (<math>p \leq 0.05</math>)</i>			

#### 4.2.2 Motilidad en la fase post-congelamiento.

En la fase de post-descongelación, se comparó los 4 tratamientos con el semen fresco encontrando diferencias estadísticas en todas las comparaciones.

Tabla 10. T test para la variable motilidad en la fase de post-congelación.

Motilidad en descongelación T test pareado					
	T0	T1	T2	T3	T4
Media	86,375	78,0625	77,875	44,1875	69,25
Varianza	14,19642857	15,17410714	14,26785714	55,92410714	58,64285714
N	8	8	8	8	8
P(T<=t) dos colas		0,000165286	0,002881972	5,02884E-07	0,000174971

En la fase de post-congelamiento, en la Tabla 11. Se observan los resultados del ADEVA. Debido a que el p-valor es menor a 0,05, se concluye que existe significación estadística entre grupos, lo que permite rechazar la hipótesis nula

de que no hay diferencia entre ellos. La motilidad en la fase de post-congelación con respecto a semen fresco tiene diferencias significativas entre los tratamientos.

Tabla 11. ADEVA para la variable motilidad en la fase post-congelamiento.

Fuente de Variabilidad	SC	g.l.	CM	Valor p	Valor crítico para F
Total	9550,60	39			
Grupos	8443,16	4	2110,79	0,0001	66,71
Error	1107,44	35	31,64		

Al realizar la prueba de Duncan al 5% (Tabla 12) para la variable motilidad en la fase de post-congelación, se puede observar que se forman cuatro rangos: "A" conformado por el tratamiento 3; "B" conformado por el tratamiento 4; "C" conformado por los tratamientos 2 y 1; y, "D" conformado por semen fresco.

Tabla 12. Prueba de Duncan al 5% para la variable motilidad en la fase de post congelación.

Grupo	Medias	N	Rangos
Tratamiento 3	44,1	8	A
Tratamiento 4	69,25	8	B
Tratamiento 2	77,88	8	C
Tratamiento 1	78,06	8	
Semen fresco	86,38	8	D
<i>Letras distintas indican diferencias significativas (<math>p \leq 0.05</math>)</i>			

Los resultados de análisis estadísticos muestran en las tres pruebas realizadas, valores significativos con respecto al control y a todas las muestras para la etapa de dilución seminal como para la etapa post congelación seminal. Los

valores de motilidad según análisis de Duncan se forman cuatro rangos: “A” conformado por los tratamientos 2 y 3; “B” conformado por el tratamiento 1; “C” conformado por el tratamiento 4 y “D” conformado por el semen fresco en etapa de Post-congelamiento y se forman cuatro rangos en motilidad de la etapa de post congelación: “A” conformado por el tratamiento 3; “B” conformado por el tratamiento 4; “C” conformado por el tratamiento 2 y 1 y “D” conformado el semen fresco.

Si bien se tiene resultados estadísticamente significativos, en la fase de dilución así como en la fase de post-congelación, el T0 (semen fresco) presenta mejores valores de motilidad respecto a los tratamientos. Los valores de los tratamientos 2 y 3 en la etapa post-congelación, no serían óptimos para la fecundidad con mayor significancia en T3 debido a que no cumplen con los parámetros normales de referencia.

Los espermatozoides de la segunda colecta se consideran más motiles que los de la primera, porque en la eyaculación salen los espermatozoides viejos almacenados en el epidídimo junto con los nuevos, mientras que en la segunda toma después de cuatro días saldrían solamente los nuevos (Stornelli ,et. Al, 2006, p.36). . En este estudio, no hay diferencia con la segunda colecta ya sin espermatozoides en el epidídimo.

Según Silva (2005), la motilidad es el parámetro más importante para tener buenos resultados en la crio preservación de semen canino, donde la capacidad fecundante del espermatozoide post congelación disminuye considerablemente, de tal manera que una simple valoración de motilidad con microscopio en dilución o post congelación, no es suficiente para determinar el valor de una pajilla

### 4.3 Concentración espermática.

#### 4.3.1 Concentración en la fase de dilución.

En la fase de dilución se comparó los cuatro tratamientos con el semen fresco, no se encontró significancia en las comparaciones.

Tabla 13. T test para la variable concentración en la fase de dilución.

Concentración en dilución T test pareado					
T0		T1	T2	T3	T4
Media	323	257,0625	322,8125	341,875	313,5
Varianza	2226,928571	2607,53125	1584,852679	2004,910714	3076,428571
N	8	8	8	8	8
P(T<=t) dos colas		0,064059453	0,992971529	0,508875497	0,781447778

En fase de dilución, los resultados en la Tabla 14. Se ve los resultados del ADEVA. Debido a que el p-valor es mayor a 0,05, se concluye que no existe significación estadística entre grupos, lo que permite aceptar la hipótesis nula de que no existe diferencia entre ellos. Es decir la concentración de espermatozoides en los diferentes tratamientos no varía representativamente en la fase de dilución.

Tabla 14. ADEVA para la variable concentración en la fase de dilución.

Fuente de Variabilidad	SC	g.l.	CM	Valor p	Valor crítico para F
Total	113706,10	39			
Grupos	33201,54	4	8300,38	0,0145	3,61
Error	80504,56	35	2300,13		

Al realizar la prueba de Duncan al 5% (Tabla 15), para la variable concentración en la fase de dilución, se puede observar que se forman dos rangos: "A" conformado por el tratamiento 1; "B" conformado por el tratamiento 4, 2, 3 y semen fresco.

Tabla 15. Prueba de Duncan al 5% para la variable concentración en la fase de dilución.

Grupo	Medias	n	Rangos
Tratamiento 1	257,06	8	A
Tratamiento 4	313,50	8	B
Tratamiento 2	322,81	8	
Semen fresco	323,00	8	
Tratamiento 3	341,88	8	
<i>Letras distintas indican diferencias significativas (<math>p \leq 0.05</math>)</i>			

#### 4.3.1 Concentración en la fase post-congelamiento.

En la fase de post-congelación, se comparó los 4 tratamientos con el semen fresco encontrando significancia en la comparación T1 con T0.

Tabla 16. T test para la variable concentración en la fase de post-congelación.

Concentración descongelación T-test pareado					
	T0	T1	T2	T3	T4
Media	323	279,4375	279,4375	354,25	284,875
Varianza	2226,928571	4862,03125	4862,03125	2588,714286	1693,910714
N	8	8	8	8	8
P(T<=t) dos colas		0,00721991	0,100734174	0,094700939	0,155884905

En la fase de post-congelación, los resultados en la Tabla 17. Se ve los resultados del ADEVA. Debido a que el p-valor es menor a 0,05, se concluye que existe significación estadística entre grupos, lo que permite rechazar la hipótesis nula de que no existe diferencia entre ellos. Es decir, la concentración espermática en fase post congelación tiene diferencias considerables entre tratamientos.

Tabla 17. ADEVA para la variable concentración en la fase post descongelación.

Fuente de Variabilidad	SC	g.l.	CM	Valor p	Valor crítico para F
Total	156868,38	39			
Grupos	64418,06	4	16104,52	0,0008	6,10
Error	92450,31	35	2641,44		

Al realizar la prueba de Duncan al 5% (Tabla 18) para la variable concentración en la fase de post congelación, se puede observar que se forman cuatro rangos: "A" conformado por el tratamiento 1; "B" conformado por los tratamientos 2 y 4; "C" conformado por el semen fresco y "D" conformado por el tratamiento 3.

Tabla 18. Prueba de Duncan al 5% para la variable concentración en la fase de post congelación.

Grupo	Medias	n	Rangos
Tratamiento 1	236,56	8	A
Tratamiento 2	279,44	8	B
Tratamiento 4	284,88	8	
Semen fresco	323,00	8	C
Tratamiento 3	354,25	8	D

*Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ )*

La concentración espermática no mostró diferencias significativas al comparar el control con los tratamientos, exceptuando en el caso de T1 para la concentración post descongelamiento. Todas las muestras presentaron concentraciones en el rango normal porque al ser diluciones de esperma, se busca estandarizar la concentración espermática de la muestra procesada. Así, el parámetro evaluado de concentración no fue relevante en el estudio, pero es de vital importancia en el procesamiento de una pajuela garantizada. Otro factor a tomar en cuenta, es la raza de los individuos evaluados en el estudio; puesto que la concentración espermática es directamente proporcional al tamaño del animal (Felman, et. Al, 2004), y para esta evaluación se usaron animales de raza gigante (peso promedio de 70kg).

#### 4.4 Medida de pH de la muestra.

##### 4.4.1 pH en la fase de dilución.

En la fase de dilución, se comparó los 4 tratamientos con el semen fresco encontrando ningún valor significativo.

Tabla 19. T test para la variable pH en la fase de dilución.

PH en descongelación T test pareado					
	T0	T1	T2	T3	T4
Media	6,56875	6,6625	6,59375	6,60625	6,65625
Varianza	0,06352678	0,03267857	0,07674107	0,0503125	0,06674107
N	8	8	8	8	8
P(T<=t) dos colas		0,41379149	0,80976558	0,80306975	0,3532331
		9	6	2	87

En la fase de dilución, los resultados en la Tabla 20. Se ve los resultados del ADEVA. Debido a que el p-valor es mayor a 0,05, se concluye que no existe

significación estadística entre grupos, lo que permite aceptar la hipótesis nula, por lo tanto los tratamientos no afectan el pH del semen después de la dilución.

Tabla 20. ADEVA para la variable “pH” en la fase de dilución.

Fuente de Variabilidad	SC	g.l.	CM	Valor p	Valor crítico para F
Total	1,59	39			
Grupos	0,05	4	0,01	0,8996	0,26
Error	1,55	35	0,04		

Al realizar la prueba de Duncan al 5% (Tabla 21) para la variable pH en la fase de dilución, se puede observar que se forma un rango: “A” conformado por el tratamiento 4, 2, 1, 3 y semen fresco.

Tabla 21. Prueba de Duncan al 5% para la variable pH en la fase de dilución.

Grupo	Medias	n	Rangos
Tratamiento 4	6,56	8	A
Semen fresco	6,57	8	
Tratamiento 2	6,59	8	
Tratamiento 1	6,63	8	
Tratamiento 3	6,64	8	
<i>Letras distintas indican diferencias significativas (<math>p \leq 0.05</math>)</i>			

#### 4.4.2 Medición de pH en la fase post-congelamiento.

En la fase de post-congelación, se comparó los 4 tratamientos con el semen fresco encontrando ningún valor significativo.

Tabla 22. T test para la variable pH en la fase de post-congelación.

PH en descongelación T test pareado					
	T0	T1	T2	T3	T4
Media	6,56875	6,6625	6,59375	6,60625	6,65625
Varianza	0,063526786	0,032678571	0,076741071	0,0503125	0,066741071
N	8	8	8	8	8
P(T<=t) dos colas		0,413791499	0,809765586	0,803069752	0,353233187

En la fase de post-congelación, los resultados en la Tabla 23. Se ve los resultados del ADEVA. Debido a que el p-valor es mayor a 0,05, se concluye que no existe significación estadística entre grupos, lo que permite aceptar la hipótesis nula de que no existe diferencia entre ellos.

Tabla 23. ADEVA para la variable pH en la fase de post- congelación.

Fuente de Variabilidad	SC	g.l.	CM	Valor p	Valor crítico para F
Total	2,08	39			
Grupos	0,05	4	0,01	0,9212	0,23
Error	2,03	35	0,06		

Al realizar la prueba de Duncan al 5% (Tabla 24) para la variable concentración en la fase de post congelación, se puede observar que se forman un rango conformado por semen fresco y los tratamientos 2,3,4 y 1.

Tabla 24. Prueba de Duncan al 5% para la variable pH en la fase de post-congelación.

Grupo	Medias	n	Rangos
Semen fresco	6,57	8	A
Tratamiento 2	6,59	8	
Tratamiento 3	6,61	8	
Tratamiento 4	6,66	8	
Tratamiento 1	6,66	8	
<i>Letras distintas indican diferencias significativas (<math>p \leq 0.05</math>)</i>			

Según Minter et, al. (2005, p.1898), la actividad metabólica de los espermatozoides puede verse afectada con una disminución de pH. Para el caso de este estudio, el cambio de pH puede producirse por influencia del diluyente. Sin embargo, no hubo modificación en ninguno de los casos y los resultados no muestran ninguna diferencia estadística significativa.

Al no cambiar el pH la tasa de congelación no se modificó porque los espermatozoides fueron viables luego de descongelar la muestra. Si se concentra el proceso en mantener el pH estable y el tiempo de estabilización y congelamiento se prolonga, se forman cristales de hielo que puedan causar mortalidad en los espermatozoides. Si por el contrario, se acelera el proceso, baja la actividad metabólica por cambio de pH y no hay motilidad (Minter et, al. 2005, p.1898).

Rota, et. Al. (1995, p. 886) indica que el pH disminuye a partir del 3 día de refrigeración causando una alta mortalidad en el semen canino; no siendo deseable para la congelación por lo que es recomendable procesar la muestra a congelarse inmediatamente después de obtenerla. Uno de los propósitos del diluyente principalmente es cuidar los cambios de pH por lo que todos los resultados fueron válidos para esta variable.

## 4.5 Defectos primarios.

### 4.5.1 Defectos primarios en la fase de dilución.

En la fase de dilución, se comparó los 4 tratamientos con el semen fresco encontrando ningún valor significativo.

Tabla 25. T test para la variable defectos primarios en la fase de dilución.

	T0	T1	T2	T3	T4
Media	6,56875	6,63125	6,59375	6,64375	6,55625
Varianza	0,063526786	0,0878125	0,02674107	0,0153125	0,02745536
N	8	8	8	8	8
P(T<=t) dos colas		0,619048337	0,83236087	0,36450494	0,87107263
Defectos primarios en dilución T test pareado					

En la fase de dilución, los resultados en la Tabla 26. Se ve los resultados del ADEVA. Debido a que el p-valor es mayor a 0,05, se concluye que no existe significación estadística entre grupos, lo que permite aceptar la hipótesis nula de que no existe diferencia entre ellos. Es los defectos primarios espermáticos no tiene diferencias significativas en relación al control.

Tabla 26. ADEVA para la variable defectos primarios en la fase de Dilución.

Fuente de Variabilidad	SC	g.l.	CM	Valor p	Valor crítico para F
Total	374,44	39			
Grupos	2,16	4	0,54	0,9949	0,05
Error	372,28	35	10,64		

Al realizar la prueba de Duncan al 5% (Tabla 27) para la variable defectos primarios en la fase de dilución, se puede observar que se forma un rango A con la eltratamiento1, 4, 2, 3 y semen fresco.

Tabla 27. Prueba de Duncan al 5% para la variable defectos primarios en la fase de dilución.

Grupo	Medias	n	Rangos
Tratamiento 1	8,75	8	A
Tratamiento 4	8,81	8	
Tratamiento 2	8,81	8	
Semen fresco	8,81	8	
Tratamiento 3	9,38	8	
<i>Letras distintas indican diferencias significativas (<math>p \leq 0.05</math>)</i>			

#### 4.5.2 Defectos primarios en la fase de dilución post-congelamiento.

En la fase de post-congelación, se comparó los 4 tratamientos con el semen fresco encontrando ningún valor significativo.

Tabla 28. T test para la variable defectos primarios en la fase de post-congelación.

Defectos primarios en descongelación T test pareado					
	T0	T1	T2	T3	T4
Media	8,8125	8,5625	6,75	8,75	7,375
Varianza	12,49553571	6,110615079	1,642857143	8,214285714	6,410714
N	8	8	8	8	8
P(T<=t) dos colas		0,820022268	0,200382985	0,97318025	0,457539971

En la fase de post-congelación, los resultados en la Tabla 29. Se ve los resultados del ADEVA. Debido a que el p-valor es mayor a 0,05, se concluye que no existe significación estadística entre grupos, lo que permite aceptar la hipótesis nula de que no existe diferencia entre ellos.

Tabla 29. ADEVA para la variable defectos primarios en la fase post descongelación.

Fuente de Variabilidad	SC	g.l.	CM	Valor p	Valor crítico para F
Total	271,96	39			
Grupos	27,84	4	6,96	0,4218	1,00
Error	244,12	35	6,97		

Al realizar la prueba de Duncan al 5% (Tabla 30) para la variable defectos primarios en la fase post descongelamiento, se puede observar que se forman un rango "A" conformado por el tratamiento 2, 4, 1, 3 y semen fresco.

Tabla 30. Prueba de Duncan al 5% para la variable defectos primarios en la fase post congelación.

Grupo	Medias	n	Rangos
Tratamiento 2	6,75	8	A
Tratamiento 4	7,38	8	
Tratamiento 1	8,56	8	
Tratamiento 3	8,75	8	
Semen fresco	8,81	8	
<i>Letras distintas indican diferencias significativas (<math>p \leq 0.05</math>)</i>			

## 4.6 Defectos secundarios.

### 4.6.1 Defectos secundarios en la fase de dilución.

En la fase de post-congelación, se comparó los 4 tratamientos con el semen fresco encontrando ningún valor significativo.

Tabla 31. T test para la variable defectos secundarios en la fase dilución.

Defectos secundarios en dilución T test pareado					
	T0	T1	T2	T3	T4
Media	13,375	14,4375	13,225	14,8125	13,1875
Varianza	8,482142857	9,959821429	9,59071429	2,78125	7,5669649
N	8	8	8	8	8

En la fase de dilución, los resultados en la Tabla 32. Se ve los resultados del ADEVA. Debido a que el p-valor es mayor a 0,05, se concluye que no existe significación estadística entre grupos, lo que permite aceptar la hipótesis nula de que no existe diferencia entre ellos. Los defectos espermáticos secundarios en fase de dilución no tienen cambios representativos con relación al control.

Tabla 32. ADEVA para la variable defectos secundarios en la fase de dilución.

Fuente de Variabilidad	SC	g.l.	CM	Valor p	Valor crítico para F
Total	282,88	39			
Grupos	15,56	4	3,89	0,7291	0,51
Error	351,44	35	10,04		

Al realizar la prueba de Duncan al 5% (Tabla 33) para la variable defectos secundarios en la fase de dilución, se puede observar que se forman un rango "A" por el tratamiento 4, 2, 1, 3 y la semen fresco.

Tabla 33. Prueba de Duncan al 5% para la variable defectos secundarios en la fase de dilución.

Grupo	Medias	n	Rangos
Tratamiento 4	13,38	8	A
Tratamiento 2	13,38	8	
Semen fresco	13,38	8	
Tratamiento 1	14,44	8	
Tratamiento 3	14,81	8	
<i>Letras distintas indican diferencias significativas (<math>p \leq 0.05</math>)</i>			

#### 4.6.2 Defectos secundarios en la fase de post-congelamiento.

En la fase de post-congelación, se comparó los 4 tratamientos con el semen fresco encontrando valores significativos para T1 en relación a T0.

Tabla 34. T test para la variable defectos secundarios en la fase de post-congelación.

	T0	T1	T2	T3	T4
Media	13,375	15,625	14,08333333	14,625	14,875
Varianza	8,482142857	5,76785714	10,4126984	2,48214286	2,26785714
N	8	8	8	8	8
P(T<=t) dos colas		1E-02	0,58674642	0,26822089	0,29189447

En la fase de dilución, los resultados en la Tabla 35. Se ve los resultados del ADEVA. Debido a que el p-valor es mayor a 0,05, se concluye que no existe significación estadística entre grupos, lo que permite aceptar la hipótesis nula de que no existe diferencia entre ellos.

Tabla 35. ADEVA para la variable defectos secundarios en la fase de post congelación.

Fuente de Variabilidad	SC	g.l.	CM	Valor p	Valor crítico para F
Total	228,77	39			
Grupos	22,88	4	5,72	0,4351	0,97
Error	205,77	35	5,88		

Al realizar la prueba de Duncan al 5% (Tabla 36) para la variable defectos secundarios en la fase de post descongelación, se puede observar que se forman un rango "A" conformado por el semen fresco, Por el tratamiento 2, 3, 4 y 1.

Tabla 36. Prueba de Duncan al 5% para la variable defectos secundarios en la fase post congelación.

Grupo	Medias	n	Rangos
Semen fresco	13,38	8	A
Tratamiento 2	14,08	8	
Tratamiento 3	14,63	8	
Tratamiento 4	14,88	8	
Tratamiento 1	15,63	8	
<i>Letras distintas indican diferencias significativas (<math>p \leq 0.05</math>)</i>			

Según los datos obtenidos de anomalías primarias y secundarias con excepción de T1 defectos secundarios en etapa post- descongelación con resultado estadísticamente significativo no se reportó más valores significativos. Sin embargo muchas muestras de los individuos en estudio presentaban anomalías fuera de rango (normal en caninos) en el estudio. En el caso de anomalías primarias su origen está en la espermatogénesis

según (Felman, et. Al, 2004) y (Hafez ,et al. 200,p. 380) o en el testículo en sí; pero en el caso de anomalías secundarias si podría estar en el proceso de la muestra según (Fastard, 1996, p.258) quien establece diferencias específicas para anomalías secundarias después de la congelación. En este estudio no se realizaron diferenciación dentro de las anomalías secundarias lo que podría ayudar a determinar mejores diferencias significativas para la congelación seminal.

## **5. CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.**

### **5.1 Conclusiones.**

En base de los resultados encontrados, se estandarizó un protocolo de crío preservación de semen canino, el cual fue adaptado a la realidad del Ecuador, utilizando equipos y materiales instalados en el propio criadero donde se realizó el estudio. El protocolo está estandarizado y se implementó un banco de esperma canino seleccionado de los mejores reproductores del criadero. Se implementó en el criadero un laboratorio de reproducción animal a partir de las evaluaciones reproductivas de los machos evaluados en el experimento.

El sistema de embalaje estandarizado en el criadero fue de pajuelas de 0.25ml con una concentración de 200 millones de espermatozoides por ml. El proceso tanto de congelamiento como de descongelamiento, fue probado y ahora es implementado en el criadero con almacenamiento en un tanque de nitrógeno que debe recargarse cada 4 meses aproximadamente.

Se analizó supervivencia y viabilidad espermática en tres etapas del experimento: semen fresco colectado, después de la dilución y después de la descongelación. Los parámetros evaluados fueron: motilidad, concentración, pH y morfología con defectos primarios y secundarios de los espermatozoides. Se determinó que al momento de la dilución, todos los tratamientos cumplían con las características normales para la fecundidad. Sin embargo, en la evaluación después de la descongelación, los espermatozoides de los tratamientos 3 (Triadyl®) y 4 (Método Noruego), no eran ideales para la fecundación por lo que no justifica su reserva como material para inseminación debido a diferencias altamente significativas en la motilidad frente a los otros tratamientos, tabla 12. Los tratamientos 1 (CaniPlus®) y 2 (CaniPro®), según los resultados obtenidos pueden ser usados para inseminación por lo que se justifica su crío preservación y reserva.

La centrifugación de las muestras obtenidas en la colecta a velocidades de 1200 a 1500 g según recomienda la literatura, fueron utilizadas en el proceso normal de congelación llevado a cabo. En nuestro experimento, al momento de la descongelación se producía compactación del semen perdiendo motilidad. Frente a esto empleamos una menor velocidad de 800g, no se tuvo problemas con la compactación en el experimento, por lo que se concluye que 800g es una velocidad de centrifugación óptima para realizar procesos de congelación seminal.

## **5.2 Recomendaciones.**

Se debe considerar los métodos de embalaje de diferentes tamaños para almacenamiento y envío, si se busca establecer la técnica para enfocarla en una actividad comercial. Experimentalmente no se consideró el tamaño de la pajuela como un factor determinante.

Se debe procesar las muestras inmediatamente después de la congelación seminal, porque los procesos de transporte agotan las reservas metabólicas de los espermatozoides (Rodríguez, et, al. 2002, p. 26). Se recomienda la realización de congelación inmediatamente después de la extracción seminal para maximizar buenos resultados.

Se podría valorar la integridad de la membrana plasmática con mejores equipos llevando estudios de microscopía electrónica. En el estudio no se efectuó una evaluación de alto nivel para el parámetro de motilidad. Así, si bien los tratamientos 1 y 2 cumplen con los parámetros normales para poder realizar una fecundación post congelación, en realidad no muestran con exactitud la capacidad fecundante de los espermatozoides. Una mejor contribución del estudio podría ser valorar fecundación en hembras, estudio del estado acrosomal, interacción gamética o integridad de la membrana plasmática. Por lo que se recomienda realizar pruebas más específicas de la integridad de las células espermáticas.

Se recomienda usar cono de recolección seminal en los experimento, porque este tiene mayor similitud a la vagina de una hembra canina incrementando el libido del perro y facilitando la pronta eyaculación en la colecta.

Cuando se va usar una perra para la colección seminal es muy importante cuidar que la hembra no lastime al macho. También se debe tener cuidado porque en estos casos, la hembra reacciona de forma agresiva pudiendo lesionar al operario.

Es recomendable si durante los procesos experimentales de cuantificación se tiene problemas con presencia de burbujas, cubre objetos, en un lugar diferente, entre otros repetir el procedimiento para cuidar la validez de los resultados.

Considerando que las respuestas espermáticas a los diferentes diluyentes y crio protectores son diferentes según la raza, estas pruebas deben efectuarse en los diferentes criaderos para determinar uso.

## REFERENCIAS.

- Bohórquez, R. De Ondiz, A. Palomares, R. Gallardo, F. (2005). Determinación del protocolo de crio preservación de semen canino: reporte preliminar. *Revista Científica*, 15(005).
- Enciso, M. Bermúdez, L. Evangelista, S. Rojas, M. Huanca, L. (2006). Estudio preliminar de colección de semen en oso de anteojos (*Tremarctosornatus*). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 17(1), pp.77-80.
- Fastard W. Semen cryopreservation in dog and foxes. *Animal reproduction science* 1996. 42: 251-260.
- Felman EC; Nelson RW. 2004. *Canine and feline endocrinology and reproduction*. EEUU: Editorial Mc Graw Interamericana. Tercera edición;
- Fosberg, CL. (1996) Artificial Insemination with semen fresh, chilled extended and frozen thawed semen in the dog. *Seminar in Veterinary Medicine and Surgery*, 10 (1), pp.48-58.
- Grossman, J. D., & Sisson, S. (1982). *Anatomía de los animales domésticos*(Vol. 616). Salvat.
- Hafez B; Hafez ES 2000. *Reproducción e Inseminación artificial en animals* Mexico: Mc Graw Hill. Séptima edición
- Harrop, AE. (1960). *Mating natural service and artificial insemination in reproduction in the dog*, London,England: Ed. Tindall y Cox.
- Hart, B. L., 1970 *Reproductive system: A, Male* In Andersen, A. C. (ed.): *The Beagle as an Experimental Dog*. Ames, Iowa, Iowa State University Press, pp. 296-312.
- Ivanova-kichea MG; Bovadob ND; Somlev B. Criopreservation of canine semen in pellets and in 5ml aluminium tubes using three extenders. *Theriogenology* 1997; 48 1343-1349
- Jara, M. Entrevista personal en Marzo del 2014.
- Minter LJ, De Liberto TJ. Influence of extender, freezing rate, and thawing rate on post-traw motility, viability and morphology of coyote (*canislatrans*) spermatozoa. *Theriogenology* 2005. 64: 1898-1912

- Ortega, N. (2008). *Métodos estadísticos para la investigación* Ortega, N 2008 (1.<sup>a</sup> ed.). Quito, Ecuador: Ediciones Fausto Reinoso.
- Petrie, A., y Watson, P. (2013). *Statistics for Veterinary and Animal Science* (3.<sup>a</sup> ed.). Hoboken, Estados Unidos: Wiley-Blackwell. Recuperado a partir de <http://www.ebilib.com>
- Rijsselaere, t. Van Soon, A. Maes, D. Kruif, A. (2002). Effect of centrifugation on in vitro survival of fresh diluted canine spermatozoa, *Theriogenol*, 57(6), pp.1669-81.
- Rijsselaere, T. Van Soon, A. Maes, D. Kruif, A. (2004). Effect of blood admixture on in vitro survival of chilled and frozen thawed canine spermatozoa, *Theriogenol*, 61(7-8), pp.1589-1602.
- Rodriguez SA; Soares CR; manchado Da Silva LD. Canine semen cryopreservation with different glicerol concentrations. *Revista Brasileira de Cienciaveterinaria* 2002; 9(1): 25-28.
- Ross, M. H., & Pawlina, W. (2007). *Histología*. Ed. Médica Panamericana.
- Rota A; Strom B; Linde-Forsberg: Effect of seminal plasma and three extender son canine semen stored at 4 °C. *Theriogenology* 1995. 44: 885-900.
- Salamon, S. Maxwell, WMC. (2000). Storage of ram semen. *AnimReprodSci*, 62, pp.77-111.
- Seager, SWJ. (1969). Successful pregnancies utilizing frozen dog semen. *AI Digest*, 17, pp.6-7.
- Senger, P. (2005). Puberty. by P. Senger), *Pathways to Pregnancy and Parturition*. Pullman: Current Conceptions, Inc. pp, 128-42.
- Silva AR; et al. Comparation between different dilution rates on canine semen freezing using Tris- buffer with the addition of egg yolk and glycerol. *Arq. Bras. Met. Vet. Zootec* 2005; 57 (6): 764-771.
- Sirivaidyapong, S. Ursen, P. Bekers, M. Colenbrander, B. (2001) Effect of prostatic fluid on motility, viability and acrosome integrity of chilled and frozen- thawed dog spermatozoa, *J ReprodFertilSuppl*, 57, pp.383-6.
- Soares Cardoso RC; et al. Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations. *Theriogelogy* 2003; 59: 743-751.

- Spallanzani L. (1776). *Observatione e esperienze in torno aivercimellispermatici del' uomo e deglianimali. Opuscoli di fisicaanimale e vegetatileopuscolo. II. Modena.*
- Stornelli, M. A. De la Sota, R. L. (2006). Fertilidad y supervivencia del semen canino criopreservado. *Analecta veterinaria*, 25(2), pp.29-38.
- Stornelli, M. A. Stornelli, M. C. Arauz, M. S. De La Sota, L. (2001). Inseminación artificial con semen fresco, refrigerado y congelado. Aplicación y desarrollo en caninos. *Analecta Vet*, 21(1), pp.58-66.
- Stornelli, M. A. Stornelli, M. C. Arauz, M. S. De La Sota, L. (2001). Inseminación artificial con semen fresco, refrigerado y congelado. Aplicación y desarrollo en caninos. *Analecta Vet*, 21(1), pp.58-66.
- Thomassen, R. Farstad, W. Krogenaes, A. Fougner, J.A. Berg, K.A. (2001). Artificial insemination with frozen semen in dogs. A retrospective study, *J ReprodFertilSuppl*, 57, pp.341-6.
- Wanke, M. M., &Gobello, C. (2006). *Reproducción en caninos y felinos domésticos*. Inter-Médica.
- Watson, PF. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *AnimReprodSci*, 60, pp.481- 492.

## **ANEXOS**

## Listado de abreviaturas

ABP (proteínas transportadoras de andrógenos)

ADEVA (Análisis de varianza)

ADN (Ácido Desoxirribonucleico).

AKC (American Kennel Club).

CASA (Computer Assisted Semen Análisis o sistemas de análisis espermático asistido por computadora).

CC (Condición corporal).

Cm (centímetros)

CDN (Cámara de Neubauer).

DMSO (Dimetil sulfoxido)

FA (fosfatasa alcalina).

FSH (hormona folículo estimulante)

g (gravedades)

GnRH (gonadoliberina)

gr (gramos)

ICSB (international Canine Semen Bank).

IA (inseminación artificial).

m (metros)

ml (mililitros)

mM (milimolar)

I (litro)

ICSB (international Canine Semen Bank)

LH (hormona luteínica)

LN2 (Nitrógeno líquido).

OFA (Fundación ortopédica para animales)

OEP (Orvus Es Paste)

PVC (Polvo polivinil)

R (radio)

RPM (revoluciones por minuto)

SF (Solución salina amortiguada con formalina).

TALP (Tyrodes Albumin Lactate Piruvate)

TINCIÓN TRIPLE (fijador, safranina y cristal violeta).

TVT (tumores venéreo transmisibles)

Tratamiento 0 (semen fresco)

Tratamiento 1 (CaniPlus®)

Tratamiento 2 (Canipro®)

Tratamiento 3 (Triladyl®)

Tratamiento 4 (Método Noruego)

Tris (Tris hidroximetil)

UI (Unidades internacionales)

V/v (volumen sobre volumen)

## Registro fotográfico

*Anexo 1.* Animales revisados periódicamente para verificar su estado de salud.



*Anexo 2.* Proceso para separar la yema de huevo.



Anexo 3. Manejo del perro para la colecta seminal.



Anexo 4. Análisis de las muestras en el microscopio.



Anexo 5. Pajuelas de 0,25ml en el proceso de estabilización.



Anexo 6. Práctica de la extracción seminal usando cono de colección.



Anexo 7. Almacenamiento de pajuelas en tanque de nitrógeno..



Anexo 8. Resultados análisis T. test

Motilidad en dilución T test pareado						Motilidad en descongelación T test pareado					
T0		T1	T2	T3	T4	T0		T1	T2	T3	T4
Media	86,38	81,31	78,5	78,56	82,63	Media	86,38	78,06	77,88	44,19	69,25
Varianza	14,2	13,64	6,214	2,96	13,2	Varianza	14,2	15,17	14,27	55,92	58,64
N	8	8	8	8	8	N	8	8	8	8	8
P(T<=t) dos colas	2E-05		6E-04	9E-05	0,042	P(T<=t) dos colas	2E-04		0,003	5E-07	2E-04
Concentración en dilución T test pareado						Concentración descongelación T test pareado					
T0		T1	T2	T3	T4	T0		T1	T2	T3	T4
Media	323	257,1	322,8	341,9	313,5	Media	323	279,4	279,4	354,3	284,9
Varianza	2227	2608	1585	2005	3076	Varianza	2227	4862	4862	2589	1694
N	8	8	8	8	8	N	8	8	8	8	8
P(T<=t) dos colas	0,064		0,993	0,509	0,781	P(T<=t) dos colas	0,007		0,101	0,095	0,156
pH en dilución T test pareado						pH en descongelación T test pareado					
T0		T1	T2	T3	T4	T0		T1	T2	T3	T4
Media	6,569	6,631	6,594	6,644	6,556	Media	6,569	6,663	6,594	6,606	6,656
Varianza	0,064	0,088	0,027	0,015	0,027	Varianza	0,064	0,033	0,077	0,05	0,067
N	8	8	8	8	8	N	8	8	8	8	8
P(T<=t) dos colas	0,619		0,832	0,365	0,871	P(T<=t) dos colas	0,414		0,81	0,803	0,353
Defectos primarios en dilución T test pareado						Defectos primarios en descongelación T test pareado					
T0		T1	T2	T3	T4	T0		T1	T2	T3	T4
Media	8,813	8,75	8,833	9,375	8,75	Media	8,813	8,563	6,75	8,75	7,375
Varianza	12,5	7,429	12,17	8,268	10,79	Varianza	12,5	6,111	1,643	8,214	6,411
N	8	8	8	8	8	N	8	8	8	8	8
P(T<=t) dos colas	0,875		0,769	0,61	0,685	P(T<=t) dos colas	0,82		0,2	0,973	0,458
Defectos secundarios en dilución T test pareado						Defectos secundarios en descongelación T test pareado					
T0		T1	T2	T3	T4	T0		T1	T2	T3	T4
Media	13,38	14,44	13,23	14,81	13,19	Media	13,38	15,63	14,08	14,63	14,88

Varianza	8,48 2	9,96	9,59 1	2,78 1	7,5 67	Varianza	8,48 2	5,76 8	10,4 1	2,48 2	2,2 68
N	8	8	8	8	8	N	8	8	8	8	8
P(T<=t) dos colas	0,18 5	0,33 2	0,28 6	0,4 02		P(T<=t) dos colas	1E- 02	0,58 7	0,26 8	0,2 92	

Anexo 9. Resultados obtenidos de la muestras en fase de dilución.

Dilución					
Motilidad					
	T1	T2	T3	T4	T0
1	76	77,5	77	82,5	82
2	78,5	78,5	77,5	83	85
3	85,5	82	81	81	93
4	86	75,5	78	84	90
5	81,5	82,5	79	85	86
6	82	76,5	80	83	85,5
7	77,5	77,5	76	75	82
8	83,5	78	80	87,5	87,5
Concentración					
	T1	T2	T3	T4	T0
1	202,5	299	299	347,5	310
2	195	311	353	303	397
3	253,5	375,5	302,5	262,5	338
4	265	361	338	249,5	361
5	337,5	361	396	273	303
6	305	302	370,5	300,5	312,5
7	214	258	280	361	327,5
8	284	315	396	411	235
pH					
	T1	T2	T3	T4	T0
1	7	6,4	6,5	6,4	6,75
2	6,3	6,65	6,65	6,5	6,75
3	6,65	6,75	6,75	6,65	6,65
4	6,9	6,5	6,5	6,4	6,15
5	6,3	6,8	6,5	6,55	6,3
6	6,9	6,4	6,75	6,85	6,85
7	6,3	6,5	6,75	6,4	6,4
8	6,7	6,75	6,75	6,7	6,7
Morfología (defectos primarios)					
	T1	T2	T3	T4	T0

1	6,5	6	8	6	6
2	6,5	5,5	6	5,5	5,5
3	12,5	14	8,5	14	14
4	7,5	9	14	9	9
5	6,5	5,5	7,5	5,5	5,5
6	13	14	13,5	14	14
7	7,5	7	8	7	7
8	10	9,5	9,5	9,5	9,5
Morfología (defectos secundarios)					
	T1	T2	T3	T4	T0
1	12,5	15	14	15	15
2	8,5	9	15	9	9
3	17	16	12	16	16
4	13,5	11	16	11	11
5	13	10	14,5	10	10
6	17,5	14,5	13,5	14,5	14,5
7	17,5	15	17	15	15
8	16	16,5	16,5	16,5	16,5

Anexo 10. Resultados obtenidos de la muestras en fase de dilución.

Post descongelación					
Motilidad					
	T1	T2	T3	T4	T0
1	70	77,5	42,5	71,5	82
2	78	76	35	68	85
3	79	82,5	50,5	71,5	93
4	83	76	47	80	90
5	76,5	75,5	55,5	75	86
6	80	74,5	49	70,5	85,5
7	77	85	38	55	82
8	81	76	36	62,5	87,5
Concentración					
	T1	T2	T3	T4	T0
1	190	205	321,5	253,5	310
2	205	334	338	265	397
3	235	262,5	396	269	338
4	257,5	300,5	396	322	361
5	307,5	376	396	258	303
6	285	346	333	361	312,5
7	202,5	215	396	242,5	327,5

8	210	196,5	257,5	308	235
pH					
	T1	T2	T3	T4	T0
1	6,55	7	6,35	6,9	6,75
2	6,65	6,9	6,3	6,9	6,75
3	6,75	6,25	6,7	6,4	6,65
4	6,9	6,4	7	6,4	6,15
5	6,4	6,65	6,55	6,75	6,3
6	6,65	6,5	6,75	7	6,85
7	6,5	6,3	6,55	6,5	6,4
8	6,9	6,75	6,65	6,4	6,7
Morfología (defectos primarios)					
	T1	T2	T3	T4	T0
1	3,5	9	9,5	12	6
2	6,5	5,5	5,5	8	5,5
3	10	6	8	4	14
4	11,33333333	8	12	9	9
5	8,66666667	7,5	9	7,5	5,5
6	9,5	6	6,5	7,5	14
7	9	5,5	13,5	4,5	7
8	10	6,5	6	6,5	9,5
Morfología (defectos secundarios)					
	T1	T2	T3	T4	T0
1	17	17,6666667	16,5	14,5	15
2	10,5	12	12,5	15,5	9
3	16,5	15	13	12	16
4	17	10,5	14,5	15	11
5	13,5	16	16	16	10
6	16,5	15	13,5	16	14,5
7	17,5	9	14,5	13,5	15
8	16,5	17,5	16,5	16,5	16,5