



UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLÍVAR.

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS RECURSOS
NATURALES Y DEL AMBIENTE.**

ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA.

TEMA:

**“EVALUACION DE LA FERTILIDAD DEL SEMEN CANINO FRESCO Y
CONGELADO, EN UN PERRO DE RAZA PITBULL TERRIER,
UTILIZANDO 3 DILUYENTES EN LA CLINICA VETERINARIA LOS
ANDES EN QUITO”**

TESIS DE GRADO PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:
MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA OTORGADO POR LA
UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLIVAR ATRAVEZ DE LA FACULTAD DE
CIENCIAS AGROPECUARIAS RECURSOS NATURALES Y MEDIO
AMBIENTE, ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

AUTORES:

LENIN SANTIAGO ALTAMIRANO CHIRIBOGA
PAULINA ALEXANDRA PEREIRA CASTRO

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. ANGELA CALDERON TOBAR MSc.

GUARANDA - ECUADOR

2011

**“EVALUACION DE LA FERTILIDAD DEL SEMEN CANINO FRESCO Y
CONGELADO, EN UN PERRO DE RAZA PITBULL TERRIER,
UTILIZANDO 3 DILUYENTES EN LA CLINICA VETERINARIA LOS
ANDES EN QUITO”**

REVISADO POR:

**Dra. ÁNGELA CALDERÓN TOBAR MSc.
DIRECTORA DE TESIS.**

**Dr. JONI ROJAS RUBIO MBA.
BIOMETRISTA.**

**APROBADO POR LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN
DE TESIS:**

**Dr. DANILO YANEZ SILVA MSc.
ÁREA TÉCNICA.**

**Dr. WASHINGTON CARRASCO MANCERO MSc.
REDACCIÓN TÉCNICA.**

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres, familia y en especial a mi hermano que con su perseverancia y apoyo ven en esta tesis culminada una etapa más de mi vida; a las personas que con sinceridad y nobleza se acercaron a mí y sirvieron de ayuda.

LENIN

Dedico este trabajo a todas las personas que me han apoyado a lo largo de mi vida y estuvieron presentes en momentos de dificultad.

PAULINA

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Estatal de Bolívar, en especial a la Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia y a todos los docentes que la conforman, por habernos permitido no solo el obtener el título superior de Médicos Veterinarios y Zootecnistas sino poner en nosotros un conocimiento que debe estar al servicio de la vida.

A los compañeros y amigos con los cuales nos forjamos en las aulas y en el campo, a ellos por ser coparticipes de formar mejores Veterinarios para el país.

A la Dra. Ángela Calderón por su ayuda y guía durante todo el proceso de tesis.

A mis padres que son mi sustento para seguir adelante en mi vida profesional, y enseñarme que la fortaleza esta en uno, y no en quien de forma artera se acerca. (Lenin Altamirano)

Agradezco a mis profesores que, con sus enseñanzas y sabiduría, me han guiado durante mis años de vida estudiantil. (Paulina Pereira)

INDICE GENERAL DE CONTENIDOS

CAPITULO	PAG
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.	4
2.1 Anatomía reproductiva	4
2.1.1 Los Testículos	4
2.1.2 El Pene	6
2.2 Fisiología reproductiva.	7
2.2.1 Los Testículos	7
2.2.2 Termorregulación testicular	8
2.2.3 Endocrinología	9
2.2.4 Espermatogénesis	10
2.2.5 Producción espermática	11
2.2.6 Estructura y función del espermatozoide	12
2.2.7 Próstata	13
2.2.8 El Pene	13
2.2.9 Semen y plasma seminal.	14
2.2.10 Eyaculación y fracciones espermáticas	15
2.2.11 Características normales del semen canino	15
2.3 Colecta del semen.	16
2.3.1 Métodos de colección de semen	16
2.4 Evaluación de la calidad seminal	19
2.4.1 Evaluación Macroscópica	19

2.4.2 Evaluación Microscópica	20
2.5 Dilución y conservación del semen	25
2.5.1 Características de los Diluyentes	27
2.6 Elaboración de la dosis seminal	34
2.6.1 Cálculo de número dosis seminales.	34
2.6.2 Cálculo de la cantidad de diluyente.	35
2.6.3 Envasado de la dosis.	35
2.7 Conservación de la dilución en fresco	36
2.8 Conservación del semen congelado.	37
III.-MATERIALES Y MÉTODOS.	38
3.1 Materiales.	38
3.1.1 Lugar del Experimento y Duración del experimento.	38
3.1.2 Material experimental.	40
3.1.3 Equipo y Materiales de Laboratorio.	40
3.2 Métodos en estudio.	44
3.2.1 Factores en estudio.	44
3.2.2 Unidades experimentales.	44
3.2.3 Tratamiento y Diseño experimental.	46
3.3 Métodos de evaluación y datos a formarse tomarse.	48
3.3.1 Variables a estudiar en el semen sometido a dilución.	49
3.3.2 Variables a Estudiar en el Semen Diluido Fresco	50
3.3.3 Variables a Estudiar en el Semen Diluido Congelado	51
3.3.4 Variables a Estudiar en las perras inseminadas.	51

3.4 Manejo del Experimento.	52
3.4.1 Procedimiento de Extracción de Semen	52
3.4.2 Procedimiento de Laboratorio	53
3.4.3 Evaluación de la dilución seminal.	64
3.4.4 Preparación de las perras para la IA	64
3.4.5 Inseminación en las perras	65
3.4.6 Detección de la Preñes	65
IV.- RESULTADOS Y DISCUSION	66
4.1 Determinación de medidas de tendencia central y variación en las características que identifican al semen antes de la dilución.	66
4.2 ADEVA, discusión y prueba de DUNCAN AL 5% de los resultados observados por 72 horas en semen diluido fresco	70
4.3 ADEVA, discusión y prueba de DUNCAN AL 5% de los resultados observados por 72 horas en semen diluido congelado.	92
4.4 Análisis de costos por dosis	104
4.4.1 Costos fijos de los equipos de laboratorio	105
4.4.2. Costos por dosis producida con el empleo leche UHT	106
4.4.3. Costos por dosis producida con el empleo del TRIS	107
4.4.4. Costos por dosis producida con el empleo del DSD	108
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	111
5.1 Conclusiones	111
5.2 Recomendaciones	112

VI.	RESUMEN / SUMMARY	113
	6.1 Resumen	113
	6.2 Sumary	114
VII.	BIBLIOGRAFÍA	115

INDICE DE CUADROS

CUADRO N°	PAG.
Cuadro N° 1: Características normales del semen canino	15
Cuadro N° 2: Motilidad espermática	21
Cuadro N° 3 Componentes del Diluyente Tris	29
Cuadro N° 4 Componentes del Diluyente Leche descremada UHT.	31
Cuadro N° 5: Componentes de la Leche descremada UHT	33
Cuadro N° 6: Situación geográfica y climática.	38
Cuadro N° 7: Esquema de los tratamientos.	46
Cuadro N° 8: Esquema del experimento.	47
Cuadro N° 9: Análisis de varianza (ADEVA) en el laboratorio.	48
Cuadro N° 10: Variables-Unidad de medida.	49
Cuadro N° 11: Variables Estudio microscópico	50
Cuadro N° 12: Variables Estudio microscópico	51
Cuadro N° 13: Variables en perras inseminadas.	51
Cuadro N° 14: Modo de clasificación de 0 -100 % para motilidad en masa y individual.	55
Cuadro N° 15: Resultado de la evaluación de semen canino sin diluir	67
Cuadro N° 16: Análisis de varianza ADEVA para la variable pH.	74
Cuadro N° 17: Prueba de Duncan al 5% en la variable pH.	73
Cuadro N° 18: Análisis de varianza ADEVA para la variable motilidad.	76
Cuadro N° 19: Prueba de Duncan al 5% en la variable motilidad.	78

Cuadro N° 20: Análisis de varianza ADEVA para la variable mortalidad	81
Cuadro N° 21: Prueba de Duncan al 5% en la variable mortalidad.	83
Cuadro N° 22: Análisis de varianza ADEVA para la variable Vitalidad.	87
Cuadro N° 23: Prueba de Duncan al 5% en la variable motilidad.	89
Cuadro N° 24: Análisis de varianza ADEVA para la variable pH a las 72 horas.	93
Cuadro N° 25: Prueba de Duncan al 5% en la variable pH a las 72 horas.	94
Cuadro N° 26: ADEVA para la variable motilidad a las 72 horas.	96
Cuadro N° 27: Prueba de Duncan al 5% en la variable motilidad a las 72 horas.	97
Cuadro N° 28: ADEVA para la variable mortalidad a las 72 horas.	99
Cuadro N° 29: Prueba de Duncan al 5% en la variable mortalidad a las 72 horas	100
Cuadro N° 30: ADEVA para la variable Vitalidad a las 72 horas.	102
Cuadro N° 31: Prueba de Duncan al 5% en la variable vitalidad a las 72 horas.	103
Cuadro N° 32: Costos fijos de los equipos de laboratorio	105
Cuadro N° 33: Costos por dosis producida con el uso del diluyente leche UHT	106
Cuadro N° 34: Costos por dosis producida con el uso del diluyente TRIS	107
Cuadro N° 35: Costos por dosis producida con el uso del diluyente DSD	108
Cuadro N° 36: Relación de costos de los diluyentes.	109

INDICE DE GRAFICOS

GRAFICO	PAG.
Grafico N° 1: Endocrinología del macho.	9
Grafico N° 2: Cámara de Neubauer.	25
Grafico N°3: Promedio de pH.	74
Grafico N°4: Promedio de motilidad.	79
Grafico N°5: Promedio de mortalidad.	84
Grafico N°6: Promedio de vitalidad.	90
Grafico N° 7: Promedio de pH a las 72 horas post dilución en semen congelado	94
Grafico N° 8: Promedio de motilidad a las 72 horas post dilución en semen congelado	97
Grafico N° 9: Promedio de mortalidad a las 72 horas post dilución en semen congelado	100
Grafico N° 10: Promedio de vitalidad a las 72 horas post dilución en semen congelado	103
Grafico N° 11: Costos de producción de cada una de las dosis de semen.	109

INDICE DE ANEXOS

ANEXO

1. Mapa de Identificación de la C. Veterinaria en el barrio Hno. Miguel
2. Croquis de Identificación de la C. Veterinaria en el barrio Hno. Miguel
3. Ficha para el registro de Laboratorio “Evaluación del Material Seminal”
4. Ficha para el registro de Laboratorio “Control de Diluyentes”
5. Registro de Laboratorio “Evaluación del Material Seminal”
6. Registro de Laboratorio “Control de Diluyentes”
7. Fotografías del trabajo de campo
8. Glosario

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años la especie canina ha tomado importancia, como especie zootécnica, ya que la venta de las crías son redituadas de forma onerosa, es por eso que el mercado exige, alta calidad genética y bajos costos en la reproducción, dado esto cada día se tecnifica con el fin de disminuir los costos de producción y obtener mayores réditos, resaltando el buen manejo reproductivo, el cual es necesario para alcanzar niveles satisfactorios de rendimiento y mejoramiento genético.

Por lo tanto, se debe hacer una vasta selección de reproductores de buena calidad, haciendo énfasis en el fenotipo y recabando información para muestrear el genotipo, con estos datos y reproductores excelentes nos resta optimizar al máximo la reproducción.

En la reproducción canina se procede a la elección del macho, tratando en lo posible, que el mismo compense los defectos de que pueda adolecer la hembra, por ende se debe optimizar al máximo el uso de esperma, potenciando su uso, para lo cual se procede a la inseminación.

Siendo el semen la materia prima fundamental y por el cual se hará la mejora genética es imprescindible que el manejo y aprovechamiento sea el más óptimo, el costo sea el mínimo y la calidad excelente.

La preparación de disolventes de semen, en forma alternativa, ayudara en gran medida alcanzar nuestro objetivo: excelente calidad, bajo costo, mejora genética y optimización de la cantidad, para lo cual contamos en el mercado con Dog Semen Diluyent, CaniPRO AI, etc.

La inseminación canina en el Ecuador, es relativamente nueva y en varios lugares donde se practican lo hacen de forma rudimentaria, realizándolo en forma de “extracción – inseminación”. La práctica, si bien es aceptada bajo la denominación de Inseminación Artificial con semen fresco, se requiere la presencia del macho y hembra en el mismo sitio. El material genético del macho (esperma) es subutilizado, ya que se puede potenciar su uso en diluciones 1:3 o 1:6, las cuales servirán para posteriores inseminaciones.

Una limitante para el desarrollo de la inseminación artificial es la adquisición de disolventes seminales y el costo en sí.

En esta investigación se planteó demostrar la eficiencia de diluyentes de tipo casero para lo cual se propuso el uso de: Tris (hidroximetil)aminometano + ácido cítrico, y leche descremada UHT vs un diluyente comercial CaninePro.

Las diluciones obtenidas mediante estos métodos se sometieron a evaluaciones constantes en laboratorio, (viabilidad espermática, mortalidad espermática, motilidad

individual) para comprobar su uso bajo la modalidad “semen fresco”, “semen congelado”.

II. REVISIÓN DE LITERATURA.

2.1 Anatomía reproductiva

2.1.1 Los Testículos

El aparato reproductor consta de dos testículos contenidos en el escroto, órganos accesorios (conductos y glándulas) y el pene. (Frandsen, 2001).

Los testículos son los órganos primarios de la reproducción del macho, miden aproximadamente 3x2x1.5 cm pesan aproximadamente 11 gramos, lo que equivale al 0.2% del peso corporal y tienen una orientación oblicua, se encuentran a la mitad de la distancia entre la región inguinal y el ano, la piel de la bolsa escrotal es pigmentada y presenta pelos finos y escasos.

El rafe testicular no es muy marcado. Están rodeados internamente por una capsula fibrosa denominada túnica albugínea, la cual forma trabeculas, que en el centro se denomina mediastino testicular. (Páramo Rosa *et al*; 1999, Frandsen 2001 y Mellisho, 2007).

Los testículos poseen las células de leydig, las cuales secretan testosterona, se asientan entre los túbulos seminíferos. (Frandsen, 2001).

La rete testis son conductos que se anastomosan en el mediastino testicular, estos se interponen entre los túbulos seminíferos y los conductos eferentes, que se unen al conducto epididimario en la cabeza del epidídimo. (Frandsen, 2001).

Las células de Sertoli se entrelazan y forman espermatides, se cree que propician el desarrollo de las células sexuales masculinas. (Frandsen, 2001).

El epidídimo es un conducto largo, contorneado, que recorren en forma paralela a los testículos y conectan los vasos eferentes y los conductos deferentes. La cabeza se encuentra en el mismo polo del testículo por donde penetran nervios y vasos, el cuerpo se prolonga por el eje mayor del testículo; mientras que la cola se continúa con el conducto deferente, y entra en el cordón espermático. (Frandsen, 2001 y Mellisho, 2007).

Los conductos deferentes son la continuación de la cola del epidídimo y expulsan a los espermatozoides desde el epidídimo hasta la uretra prostática, este atraviesa el conducto inguinal como parte del cordón espermático. (Frandsen, 2001).

El escroto es suave y de paredes delgadas un saco cutáneo, generalmente sin pelos que contienen a los testículos, en la parte interna y en contacto con los testículos se encuentra la túnica dartos, que se halla formando un tabique medio entre los dos testículos. (Páramo Rosa *et al*; 1999, Frandsen, 2001).

El cordón espermático está formado por vasos sanguíneos, nervios, conducto deferente y fibras del músculo liso (músculo cremáster), que se hallan atravesando el anillo inguinal, el cual está formado por el borde interior del músculo oblicuo externo. (Frandsen, 2001).

Las glándulas sexuales accesorias son: ampollas de los conductos deferentes y próstata. Estas glándulas secretan la mayor parte de los líquidos seminales o semen; indispensable para transportar los espermatozoides, medio de su nutrición y amortiguador contra el exceso de acidez del conducto genital femenino. (Frandsen, 2001).

Las ampollas son dilataciones glandulares de los conductos deferentes, de pequeño tamaño, y su secreción aporta fluidez al semen. (Frandsen, 2001).

La glándula prostática es difusa, se halla rodeando a la uretra, y sus conductos se abren a cada lado del conducto uretral, y su secreción conforma el 70% de los eyaculado. (Frandsen, 2001; Mellisho, 2007).

2.1.2 El Pene

El pene es de contextura suave, rosado y húmedo; es un órgano vascular y eréctil que se divide en 3 porciones que son glande, cuerpo y raíz; la estructura interna del pene es de tejido cavernoso (tejido eréctil), la raíz se inserta a la superficie caudal del arco

isquiático, en la parte ventral del cuerpo del pene se encuentra la uretra. (Mellisho, 2007; Frandson 2001 y Páramo Rosa *et al*; 1999).

En el glande del perro se encuentran los bulbos basales el cual posee las terminaciones sensitivas, consta de dos partes, la porción larga y el bulbo, las cuales son rodeadas de un hueso acanalado (os penis). El prepucio es una porción de piel que rodea la extremidad libre del pene. (Frandson, 2001; asiaSpain.com, 2010).

El perro posee un hueso peneano que consta de: Parte callosa (en la punta) Parte ósea. La función del hueso es dar consistencia al pene ya que tiene que penetrar flácido en la vagina femenina (asiaSpain.com, 2010).

2.2 Fisiología reproductiva.

2.2.1 Los Testículos

Los testículos tienen como función principal la producción de espermatozoides y de hormonas, las células de Leydig se encargan de la producción de testosterona principalmente, y dihidrotestosterona (DHT) y dihidroepiandrosterona (DHEA), androstendiona y estradiol. (Wanke María, 2006).

En los túbulos seminíferos están las células espermatogénicas, y las células de Sertoli, que producen inhibina, activina y la Proteína ligadora de Andrógenos (PLA). (Wanke María, 2006).

2.2.2 Termorregulación testicular

Para la espermatogénesis se necesitan 2°C menos que la temperatura existente en el cuerpo. Para conseguirlo, existen dos mecanismos, el primero es el intercambio del calor contracorriente en el plexo pampiniforme y posición testicular. (asiaSpain.com, 2010 y Wanke María, 2006).

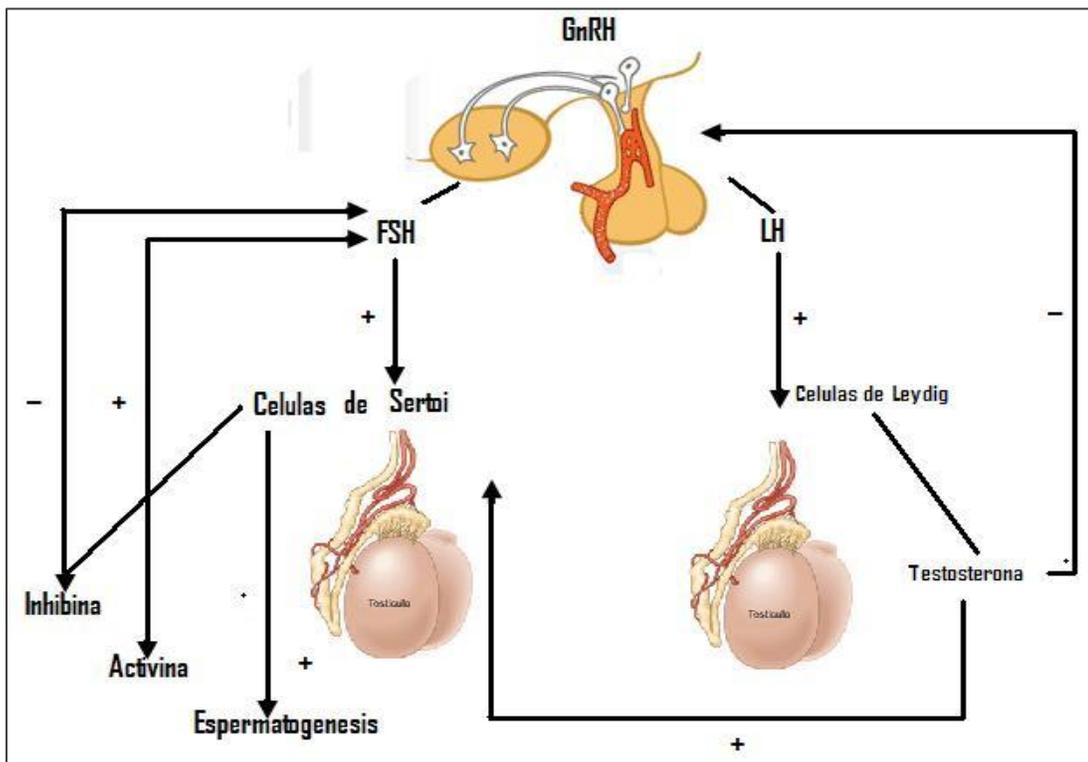
La termorregulación está dada por la combinación del plexo pampiniforme, el escroto, la túnica dartos y el músculo cremáster. Los testículos se rodean de varias capas la piel del escroto, la capa externa, abundante en glándulas sudoríparas, la túnica dartos por bajo la piel del escroto rodea a los dos testículos, esta se contrae de forma que disminuye la superficie expuesta al exterior ayudando a la termorregulación, el tejido conjuntivo subdartóico, bajo la túnica dartos separa los dos testículos y es un aislante térmico. (asiaSpain.com, 2010).

El testículo está unido a la cavidad abdominal por el cordón testicular formado por el músculo cremáster, arterias, venas y los conductos deferentes que ayudan a la termorregulación. El músculo cremáster se contrae con el frío de manera que el

testículo sube. Las arterias llevan sangre más caliente que las venas las cuales rodean las arterias enfriando su sangre. (asiaSpain.com, 2010).

2.2.3 Endocrinología

Gráfico N° 1: Endocrinología del macho.



Fuente: Manejo de procreación, <http://www.tc.umn.edu/>

El esquema demuestra la relación entre las hormonas hipofisarias que actúan sobre las células de Leydig y Sertoli, y el control mediante retroalimentación (feedback) de las hormonas gonadales desde la hipófisis y el hipotálamo. (Wanke María, 2006).

Si los niveles de testosterona en sangre periférica aumentan (bien como resultado del aumento en su producción por los testículos, bien por administración exógena) ejerce una retroalimentación negativa sobre hipotálamo e hipófisis suprimiendo la liberación de GnRH y LH. Como consecuencia las células de Leydig producen menos testosterona y la concentración de esta hormona en los túbulos seminíferos cae. La FSH actúa directamente sobre las células de Sertoli; estas secretan 2 hormonas: inhibina, que actúa sobre la adenohipoflisis suprimiendo selectivamente la liberación de FSH en respuesta a la GnRH, y activina que estimula la liberación de FSH. Las células de Sertoli también secretan una proteína ligadora de andrógenos (PLA). (Wanke María, 2006 y Frandson, 2001).

2.2.4 Espermatogénesis

Es el proceso por el cual los espermatogonios se transforman en espermatozoides, el proceso se divide en espermacitogénesis y espermatogénesis. (Wanke María, 2006).

La espermatogénesis comienza cuando las espermatogonios inician un periodo de división mitótica seguido de la reducción meiótica del genoma diploide ($2n$) para formar células haploides ($1n$); seguidas por la diferenciación morfológica de las espermatides en espermatozoides. (Wanke María, 2006 y Hill *et al.* 2006).

La gametogénesis empieza durante la vida fetal, donde los espermatogonios se dividen por mitosis para aumentar la cantidad de células (proliferación); proceso que se interrumpe al nacer y reinicia en la pubertad; donde los espermatogonios diploides entran a meiosis para generar una provisión continúa de espermatozoides. (Hill *et al.* 2006).

Al comienzo de la primera división meiótica tiene lugar la replicación del ADN de cada cromosoma. Después de la replicación de los cromosomas de un espermatogonio, la célula se denomina espermatocito primario, la cual tras la primera división meiótica produce dos espermatocitos secundarios, los cuales al atravesar la segunda división meiótica produce cuatro espermátides, las cuales evolucionan hasta espermatozoides maduros (Hill *et al.* 2006).

2.2.5 Producción espermática

La producción de espermatozoides esta directamente correlacionada con la masa testicular, y esta a su vez con el tamaño del animal, por lo tanto la producción de espermatozoides es superior en perros de mayor tamaño. Además, el volumen total del eyaculado también se correlaciona positivamente con el tamaño del animal. El volumen testicular se puede determinar mediante ecografía utilizando la siguiente fórmula: longitud x altura x ancho x 0,71. (Hill *et al.* 2006).

2.2.6 Estructura y función del espermatozoide

El espermatozoide es una célula especializada que se puede dividir en tres segmentos principales: cabeza, pieza intermedia y cola. Las dimensiones del espermatozoide canino son longitud total $68 \pm 0,3$ μm , longitud de la cabeza 7 μm , ancho de la cabeza $5 \pm 0,1$ μm , longitud de la pieza intermedia $11 \pm 0,2$ μm y longitud de la cola, $50 \pm 0,3$ μm . (Wanke María, 2006).

La cabeza está formada por el material genético, cromatina espermática muy condensada y acrosoma, esta última estructura contiene enzimas como la hialuronidasa y acrosina, encargadas de dispersar las células del cumulus y facilitar la penetración del espermatozoide en la zona pelucida del oocito. (Wanke María, 2006).

La pieza intermedia posee una gran cantidad de mitocondrias concentradas en una vaina helicoidal que proveen de energía al espermatozoide produciendo ATP. (<http://www.scribd.com/doc/8481761/Definicion-y-Estructura-Del-Espermatozoide>, 2010)

La cola es la que proporciona movilidad y es una prolongación simplemente cubierta de membrana. (<http://www.scribd.com/doc/8481761/Definicion-y-Estructura-Del-Espermatozoide>, 2010)

El espermatozoide metaboliza moléculas sencillas, principalmente azúcares (glucosa, fructosa, manosa y piruvato) tanto por vías aeróbicas como por vías anaeróbicas para obtener energía, para la movilidad y el mantenimiento del gradiente iónico a través de la membrana. (Wanke María, 2006)

2.2.7 Próstata

Es la única glándula accesoria en el perro, es bilobulada simétrica, su función es la secreción de plasma seminal, origina la primera y tercera fracción del eyaculado en el perro es de color claro y se elimina tras producirse el abotonamiento, posee un pH de 6 a 7,4 el que da al semen su olor característico, estimula la motilidad del semen y neutraliza el pH ácido vagina, en reproducción es mejor desechar la primera fracción para prolongar la vida útil del semen cuando se refrigera o congela. (Esquivel *et al* 2007; Wanke María, 2006; Root Margareth, 2005 y Frandson 2001).

2.2.8 El Pene

Es el órgano copulador masculino, este posee un hueso, el os penis, que le da rigidez y hace que el perro pueda penetrar antes de comenzar la erección. La copula tiene dos fases la primera que consiste en penetración, erección e inicio de formación del abotonamiento y la segunda en la que se completa el abotonamiento. (www.foyel.com/reproduccion_canina/index.html, 2010; Wanke María, 2006).

La primera fase inicia una vez que el perro ha logrado la penetración, comienza la erección que se completa dentro de la vagina de la perra, en la parte posterior existe una estructura eréctil llamada bulbo del glande, que al hincharse dentro de la perra impide que este se salga mientras dura la erección; la perra cierra un anillo muscular llamado esfínter vulvar por detrás del bulbo impidiendo que este se salga. (www.foyel.com/reproduccion_canina/index.html, 2010; Wanke María, 2006).

La segunda fase en la que la erección se completa el perro desmonta y pasando un miembro posterior por sobre el lomo de la perra, gira quedando la pareja mirando para lados opuestos trabados por sus genitales. A esto se le llama abotonamiento la que puede durar hasta una hora. (www.foyel.com/reproduccion_canina/index.html, 2010; Wanke María, 2006).

2.2.9 Semen y plasma seminal.

Es la suspensión celular líquida que contiene los gametos masculinos y las secreciones de los órganos accesorios del aparato reproductor masculino, la formación de dicha suspensión que se forma durante la eyaculación se conoce como plasma seminal, (Hafez, 2002).

2.2.10 Eyaculación y fracciones espermáticas

El semen se eyacula en tres fracciones, primera que es pre-espermática de origen prostático, escaso volumen y apariencia acuosa, y su función es limpiar la uretra, la segunda fracción o espermática se origina en la cola del epidídimo es de volumen variable de entre 1 a 4 ml., dependiendo del tamaño del animal y de color blanco nacarado, la tercera fracción, de origen prostático es la de mayor volumen (de 1 a 80 ml) y de aspecto acuoso, los espermatozoides viven al menos cinco días en el aparato genital de la hembra. (Wanke Maria 2006; y Root Margareth 2005).

2.2.11 Características normales del semen canino

Cuadro N° 1: Características normales del semen canino

	Fracción I	Fracción II	Fracción III	Eyaculado completo
Volumen (ml)	0.5 - 5	1 - 4	1 - 80	2.5 - >80
Color	Transparente, acuoso	Blanco, nacarado	Transparente, acuoso	Blanco
Concentración (10^6 /ml)		4 - 400		4 - 400
Espermatozoides totales por eyaculado (10^6 /ml)		300 - 2000		300 - 2000
Motilidad progresiva %		> 70		>70
Formas normales (%)		> 80		> 80
pH			6,3 - 6,7	6,3 - 6,7

Fuente: Wanke Maria 2006

2.3 Colecta del semen.

La colecta de semen es importante para los programas de I.A. Para ellos se requiere programar a los machos a intervalos óptimos, prepararlos sexualmente y aplicar técnicas correctas. (Hafez, 2002).

La colecta se realiza con o sin la presencia de la perra de provocación, se coloca en un ambiente cómodo y tranquilo. La mayoría de machos, una vez acostumbrados a la recolección, no requieren la presencia de la perra, pero eyaculan un número mayor de espermatozoides, especialmente si la perra esta en estro, se han tenido éxito empleando sustancias similares a las feromonas (ácido metilester hidroxibenzoico) que estimula el interés del macho; otro procedimiento es el uso de esponjas de algodón impregnadas con secreción vulvar de perras en estro. (Esquivel *et al*, 2007 y Root Margareth, 2005).

El macho deberá ser utilizado cada 4 a 5 días y para maximizar la producción de semen hay que tomar en cuenta los siguientes parámetros; nutrición, raza, clima y tamaño testicular. (www.cryocel.com/cryocelesp. 2010).

2.3.1 Métodos de colección de semen

Existen tres métodos para colectar el semen canino, estos son: manual, vagina artificial y electroeyaculación (Esquivel, *et al* 2010).

a) Técnica manual

La manipulación manual para conseguir la erección y la eyaculación es el método más comúnmente empleado para recoger muestras de semen, porque en general es fácil, barata, no afecta la calidad y la cantidad del eyaculado, es indolora, inocua y no es estresante para el animal. (www.foyel.com/reproduccion_canina/index.html, 2010; Esquivel *et al*; 2007).

Cuando se va a coleccionar semen, el material debe estar listo, estéril y a la mano. El perro y la perra en caso de tenerla deben estar con sus manejadores en un sitio tranquilo. (Esquivel *et al*; 2007).

El técnico sujeta el pene del perro y el prepucio se aplica un masaje suave sobre el prepucio hasta que el bulbo peneano empieza a aumentar de tamaño (primera fase de la erección), prolapsa el pene del prepucio ejerciendo presión en la zona proximal al glande y empujando hacia la abertura prepucial, queda expuesto el pene y el bulbo (segunda fase de la erección), posteriormente se recorre el prepucio; hecho esto, el pene se debe manejar con la mano enguantada y se debe girar 180 grados hacia atrás aplicando estímulos pulsátiles alrededor y por detrás del bulbo peneano, con el objeto de simular el abotonamiento que ocurre en una monta natural, dando como resultado la excitación del macho y por lo tanto, la obtención de un buen eyaculado, el cual será coleccionado en un tubo previamente esterilizado, y que facilite la medición del volumen y la observación de las características físicas del eyaculado, se

mantendrá a una temperatura constante. (Esquivel *et al* 2007; Root Margareth 2005 www.foyel.com/reproduccion_canina/index.html, 2010;).

b) Vagina Artificial.

Esta vagina tiene un espacio para ser llenado con agua y es operada mediante una bomba de mano que proporciona estímulos pulsátiles dando como resultado la eyaculación. (Esquivel *et al*; 2007).

c) Electroeyaculación

Esta técnica solo se usa con fines de investigación, o para trabajar canideos de zoológico, ya que es muy traumática, es necesario anestésiar al animal y la calidad del eyaculado es baja. La técnica consiste en la aplicación de estímulos eléctricos (corriente alterna de 30 volts) por medio de un dispositivo (electroeyaculador), en un polo del aparato se conecta a una pieza metálica aproximadamente del grosor de un lápiz y de 10 cm de longitud, esta porción se introduce en el recto del animal, el otro polo es una pinza que se fija a la pared de los sacos anales. La operación dura 1 minuto, durante el cual se aplican los estímulos eléctricos en forma intermitente durante 1 a 3 segundos con períodos de descanso de 7 a 9 segundos, el volumen del eyaculado varía entre 0.5 y 0.8 ml. (Esquivel *et al*; 2007).

2.4 Evaluación de la calidad seminal

El análisis del semen es parte de la rutina y consigue determinar si el animal es apto para la reproducción. Una vez recolectado, el semen debe mantenerse a una temperatura constante. Los espermatozoides caninos parecen ser más resistentes a las fluctuaciones de temperatura ("golpe de frío") que los de otras especies domésticas. (Esquivel *et al* 2007; Root Margareth, 2005; Castro *et al* 1999).

2.4.1 Evaluación Macroscópica

Esta evaluación incluye todas las características que puedan ser observadas a simple vista, estas son:

a) Volumen.- Para evaluar el volúmen el semen debe ser colectado en un tubo graduado, este valor se necesita para calcular el número total de espermatozoides en el eyaculado y varía dependiendo de factores como la edad, tamaño del perro, frecuencia de colección, cantidad colectada de líquido prostático, época del año, etc., obteniéndose un volúmen de 1 hasta 40 ml por eyaculado y no está relacionado con la fertilidad del animal. (Esquivel *et al* 2007; Root Margareth, 2005 y Castro *et al*, 1999).

b) Color.- El color normal del semen varía desde gris transparente hasta blanco lechoso, ésta variación depende directamente de la concentración espermática.

Cualquier coloración anormal debe alertar de algún problema en el aparato genital del macho, por ejemplo, el color rojo indica la presencia de sangre, ya sea de la superficie del pene o de la próstata, el color amarillo indica la presencia de orina y partículas blancas pueden ser indicativas de la presencia de leucocitos. (Esquivel *et al*, 2007; Root Margareth; 2005).

c) pH.- debe medirse inmediatamente y debe determinarse empleando un método muy preciso. El pH normal del semen canino se encuentra en un rango de 6.3 a 7 y depende de la cantidad de líquido. Una disminución en el pH puede atribuirse a una eyaculación incompleta o bien a la inflamación de los testículos y epidídimos. (Esquivel *et al*; 2007).

d) Olor.- procede de las glándulas prepuciales, saco prepucial y sacos anales, en general podemos decir que en este punto se busca que no presente olor pútrido, ácido, urinoso (amoniacal), etc. teniendo un olor característico de la especie. (www.fcm.org.mx/invest/inseminacion.shtml; 2010).

2.4.2 Evaluación Microscópica

a) Motilidad.- es un parámetro importante en la evaluación de la calidad de semen canino y debe ser superior al 70% en una muestra normal, este parámetro indica la habilidad de los espermatozoides para alcanzar al óvulo y fertilizarlo. y deberá evaluarse a 37°C. (Esquivel *et al*; 2007 y Wanke Maria, 2006).

El portaobjetos y el cubreobjetos deben estar a temperatura corporal (37°C) para este procedimiento, ya que la exposición a temperaturas más frías que la corporal tiene un impacto en la motilidad observada, la motilidad en el portaobjetos se reduce significativamente tras 1-2 minutos en un microscopio de luz. (Root Margareth, 2005).

Para valorar la motilidad, se coloca una gota de semen en un portaobjetos y la examina a 100 X – 200X aumentos. Hay que evaluar la velocidad y dirección del movimiento de los espermatozoides. (Root Margareth, 2005).

La motilidad puede evaluarse de acuerdo a los siguientes parámetros:

Cuadro N° 2: Motilidad

Calificación	Movimiento en masa.	Movimiento individual.
Muy buena (75 -100%)	Remolino Rápido	Remolino Rápido
Buena (50 -75%)	Remolinos Lentos	Remolino Moderado
Regular (25 -50%)	Oscilantes	Lento
Mala (0 – 25%)	Vibración	Muy Lento

Funte: Camacho, 2000

b) Morfología.- La forma de los espermatozoides es una característica importante porque afecta a la motilidad. Esto se hace tomando una gota de semen, a la que se le agrega una gota de eosina - nigrosina y se hace un extendido; posteriormente se pone un cubreobjetos y se observa al microscopio un número de 100 espermatozoides en 4

campos distintos, las anormalidades del espermatozoide se clasifican en primarias y secundarias conforme al sitio donde se localiza el defecto. (Esquivel *et al*, 2007; Root Margareth, 2005).

Las anormalidades primarias o mayores son aquellas que se dan en los testículos durante la producción. Estas anormalidades incluyen tamaño y forma inusual de la cabeza, encurvamiento de la parte media, la presencia de gotas citoplasmáticas proximales y cabezas separadas si están presentes en gran número. (Root Margareth, 2005).

Las anormalidades secundarias o menores se producen durante la maduración en el epidídimo, en el tránsito por los conductos deferentes o la uretra, o como artefactos de la recolección o preparación de la muestra. Estas incluyen colas curvadas o enrolladas y gotas citoplasmáticas distales (Root Margareth, 2005).

Root Margarth enuncia -“la muestra aceptable debe contener un 70% o más de espermatozoides morfológicamente normales”- en tanto Wanke María manifiesta -“la proporción de espermatozoides con defectos primarios y secundarios no debe exceder el 30 – 40%”-; mientras Esquivel cita que “un perro normal debe tener un 80% de espermatozoides normales y un máximo de 20% de espermatozoides anormales”.

c) Valoración Vital.- Con el propósito de evaluar la valoración vital espermática, de una muestra de semen se toma una gota, a la que se le agrega una gota de eosina -

nigrosina y se hace un extendido; posteriormente se le pone un cubreobjetos y se observa al microscopio un número de 100 espermatozoides en 4 campos distintos los espermatozoides vivos no presentan coloración mientras que los muertos se tiñen de rojo debido a la pasividad de sus membranas, al penetrar la eosina, la nigrosina tan solo sirve de contraste quedando depositado en el fondo del portaobjetos (Esquivel *et al*, 2007; Root Margareth, 2005 y Rillo *et al*, 2001).

Según la Federación Canofila Mexicana la mortalidad espermática no debe ser mayor al 10% y si rebaza este valor no es de buena calidad y por lo tanto no debe ser utilizado.

d) Concentración espermática.- La concentración es el número de espermatozoides por ml de semen. El número de espermatozoides en el eyaculado se determina multiplicando la concentración por el volumen total colectado.

La concentración puede variar dependiendo de la edad, raza, estado fisiológico, sanitarios, tamaño testicular, actividad sexual, época del año y ritmo de recogida. (Rillo *et al*, 2001).

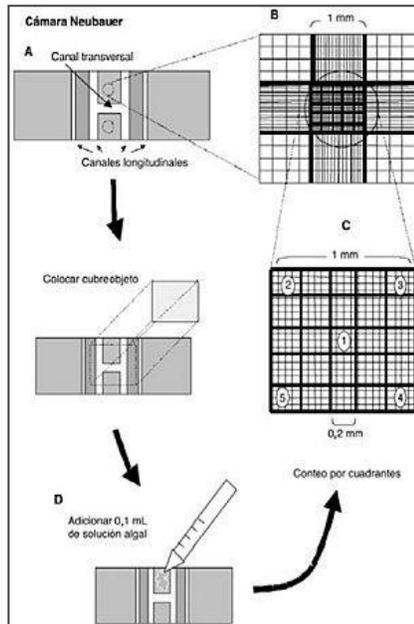
Los espermatozoides se cuentan con la ayuda de la cámara Neubauer, Burker o fotolorímetro. (Kubus, 2000).

En una pipeta se hará la dilución de solución salina al 2.9 % de 1:100, después se

llenara la cámara Neubauer y se contabilizara los espermatozoides de los cuadros de los extremos y centro de cada cámara. La cámara Neubauer tiene 2 cámaras, por lo tanto, se cuentan 5 cuadros en cada cámara, se suman los resultados de las dos cámaras y se dividen entre dos para sacar el promedio y el resultado (número de espermatozoides) se multiplica por 5×10^6 según el factor de dilución (1:100 es por 5×10^6), obteniéndose así la concentración espermática por ml. de eyaculado. Se multiplicara la concentración obtenida en cada ml., por el volumen colectado; dando como resultado el número de espermatozoides total por eyaculado.

En un eyaculado normal existen en promedio de 200 a 1000 millones de espermatozoides por mililitro y por lo menos 100 millones son necesarios para gestar una perra, siempre y cuando se insemine con semen fresco. Cuando el semen es congelado la concentración espermática debe ser mayor debido a la muerte de espermatozoides ocasionada por los procesos de congelamiento y descongelamiento (Esquivel, 2006).

Grafico N° 2: Cámara de Neubauer.



Fuente: Uriel 93 “Cámara de Neubauer”<http://uriel-93.over>

2.5 Dilución y conservación del semen

La dilución tiene por objeto aumentar el volumen total del eyaculado, con el fin de, poder, a partir de una sola eyaculación, inseminar el mayor número de hembras y crear por otra parte un medio favorable para la supervivencia de los espermatozoides.

La materia prima básica para la dilución es el diluyente seminal el cual es una solución acuosa que facilita el aumento del volumen del eyaculado, con el fin de

conseguir incrementar las dosis necesarias y conservar las características de funcionalidad de las células espermáticas, manteniendo el nivel de fertilidad preciso. www.3tres3.com/inseminacion_artificial/microsite/micro_SPvet_caracteristicas.pdf, 2010).

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

- Poseer una presión osmótica isotónica con la de la sangre del macho y ser capaz de conservarla durante el almacenamiento a un nivel aproximado.
- Proporcionar un equilibrio adecuado de elementos minerales esenciales para la vida de las células espermáticas.
- Aportar los nutrientes que precisan los zoospermos, para su metabolismo aerobio y anaerobio.
- Suministrar lipoproteínas y/o lecitinas que protegen a los nemaspermos del choque a frígido.
- Proveer de sustancias químicas que tengan poder tampón sobre los productos finales del metabolismo citospermático.
- Aportar sustancias reductoras para proteger las enzimas celulares dotadas de grupos sulfhídricos.

- Evitar la contaminación y proliferación de bacterias nocivas para los nemaspermos, el aparato genital femenino, la fecundación y la implantación del huevo fecundado.
- Ser de fácil aplicación y económico.
- Aumentar el volumen del eyaculado sin afectar la calidad seminal y conservar la capacidad fecundante de los espermatozoides durante mayor tiempo posible.
- El control de parámetros físico-químico: presión osmótica, pH, pK y fuerza iónica de interacción con el espermatozoide y el plasma seminal.
- La captación de iones de Ca^{++} , Mg^{++} , y Zn^{++} .
- El control que ejerce sobre el metabolismo de la célula espermática y la preservación de su membrana.
- Abastecer nutrientes como fuente de energía.
- Proteger a las células espermáticas durante la congelación. (Calderón Ángela 2007; Hafez, 2002; Esnalona, 1992).

2.5.1 Características de los Diluyentes

a) Características del Diluyente Comercial

Numerosas compañías especializadas comercializan diluyentes de semen canino fresco, refrigerado diluido y congelado – descongelado. La composición de este

producto no se revelan por que suelen ser información patentada, esto combinado con la falta de reportes científicos hacen difícil o imposible la comparación con diluyentes no patentados en los cuales se dispone la información bien documentada. (Wanke Maria, 2006).

El diluyente comercial elegido es el CaninePro, que es un diluyente para la conservación de semen de perro, que se presenta en forma de polvo en bolsitas para la preparación de 100 ml de diluyente por bolsita, esta debe conservarse cerrada en ambiente frío ($< +10^{\circ}$). La mezcla en polvo para el diluyente viene adicionada de antibiótico (Gentamicina). El pH ha sido estandarizado, siendo innecesario su control por el usuario. (Minutube Abfull und Labortechnik GmbH & Co.KG, 2010).

Acción

- Estimula y mejora el transporte espermático y la nidación embrionaria.
- Controla la contaminación bacteriana presente en el eyaculado.
- Permite la rápida estabilización del pH del semen diluido.
- Reduce la degradación espermática cuando existen niveles altos de morfo-anomalías.
- Controla problemas de aglutinación espermática.

Preparación del diluyente.- Para la mezcla del diluyente se requieren 100 ml de agua bidestilada estéril, libre de pirógenos. El polvo de una bolsita es adicionado al

agua precalentada a +35° C agitando suavemente, hasta su dilución total. Para ello es especialmente recomendable un agitador' magnético. Se alcanza la dilución total del polvo al desaparecer toda la traza de sedimento. (Minutube Abfull und Labortechnik GmbH & Co.KG, 2010).

Procesamiento del semen.- El procesamiento del semen *debe* efectuarse tras cumplir un cuidadoso examen previo del eyaculado. Durante el proceso de dilución debe cuidarse estrictamente la igualdad de temperaturas del semen con el diluyente. (Minutube Abfull und Labortechnik GmbH & Co.KG, 2010).

b) Características del Diluyente Tris (hidroximetil)aminometano + ácido cítrico.

Cuadro N° 3 Componentes del Diluyente Tris

Tris	3.025 gramos
Acido cítrico	1.7 gramos
Fructosa	1.25 gramos
Estreptomicina	0.1 gramos
Bencilpenicilina	0.06 gramos
Yema de huevo	20%

Fuente: Wanke Maria 2006,
Baquero, et al 2004

Ventajas

La ventaja es que la mayor parte de las farmacias pueden ayudar a preparar este diluyente, se pueden almacenar en porciones más pequeñas si se suprime el uso de yema de huevo. (Wanke Maria; 2006).

El uso de Tris (hidroximetil)aminometano en la formulación de diluyentes nos aporta como excelente factor tamponante, estableciendo un equilibrio acido-base.

(<http://es.wikipedia.org/wiki/Tris>; 2010).

El uso de Acido Citrico en la formulación del diluyente aporta con su acción de conservante y antioxidante natural y son buenos controladores del pH de soluciones ácidas. (http://es.wikipedia.org/wiki/Acido_citrico; 2010).

El aporte de fructosa contribuye la energía necesaria que requieren los espermatozoides para la supervivencia y motilidad. (<http://es.wikipedia.org/wiki/Fructosa>; 2010).

La adición de antibióticos aporta la erradicación y evita la formación de microorganismos patógenos en la dilución.

El aporte obtenido de la yema de huevo es suministrar lipoproteínas y lecitinas que protegen a los espermios del choque a frígido. (Hafez, 2002).

c) Características del Diluyente Leche descremada UHT.

Cuadro N° 4 Componentes del Diluyente Leche descremada UHT.

Leche UHT	4 ml
Estreptomicina	0.05 gramos
Bencilpenicilina	0.05 gramos
Yema de huevo	20%

Fuente: Wanke Maria 2006,
Baquero, et al 2004

Ventajas

La mayor ventaja es que es una fórmula de fácil acceso y la de más bajo costo.

El empleo de leche descremada fluida UHT (0.5% materia grasa), sin incorporación de sustancias buffer y azúcar, como diluyente para la conservación de semen canino, proporciona resultados de motilidad progresiva e integridad de membrana espermática que permitirían su utilización en inseminación artificial. (Sanchez *et al* 2006; Baquero *et al*, 2004).

La adición de antibióticos aporta la erradicación y evita la formación de microorganismos patógenos en la dilución.

El aporte obtenido de la yema de huevo es de suministrar lipoproteínas y lecitinas que protegen a los nemaspermos del choque a frígido. (Hafez, 2002).

Características de Leche descremada UHT

Se la obtiene del procesamiento de ultrapasteurización o uperización, también conocida por las siglas UHT (Ultra High Temperature) y UAT (Ultra Alta Temperatura), es un proceso térmico para obtener **esterilidad** comercial en **alimentos** como la **leche**, sin cambiar sus propiedades **nutricionales** y cambiando su sabor ligeramente. (<http://es.wikipedia.org/wiki/Ultrapasteurizaci%C3%B3n>, 2010).

Consiste en exponer la leche durante un corto lapso (de 2 a 4 segundos) a una **temperatura** que oscila entre 135 y 140 °C y seguido de un rápido enfriamiento, no superior a 32°C. Esto se hace de una forma continua y en recinto cerrado que garantiza que el producto no se **contamine** mediante el envasado **aséptico**. Este proceso aporta a la leche un suave sabor a cocido debido a una suave caramelización de la **lactosa** (azúcar de la leche). (<http://es.wikipedia.org/wiki/Ultrapasteuriza>, 2010).

La alta temperatura reduce el tiempo del proceso, y de esta manera se reduce también la pérdida de nutrientes, la leche UHT tiene una vida típica de seis a nueve meses, antes de que se abra. (<http://es.wikipedia.org/wiki/Ultrapasteurizaci%C3%B3n>, 2010).

Cuadro N° 5: Componentes de la Leche descremada UHT

Nutrientes	
Agua, g	88,0
Energía, kcal	61,0
Proteína, gr.	3,2
Grasa, gr.	0,3
Lactosa, gr.	4,7
Minerales, gr.	0,72
MINERALES mg/100 ml	
Potasio	138
Calcio	125
Cloro	103
Fósforo	96
Sodio	8
Azufre	3
Magnesio	12
Minerales trazas2	<0,1
VITAMINAS ug/100 ml1	
Vit. A	30,0
Vit. D	0,06
Vit. E	88,0
Vit. K	17,0
Vit. B1	37,0
Vit. B2	180,0
Vit. B6	46,0
Vit. B12	0,42
Vit. C	1,7

Fuente: (http://www.agrobit.com/Info_tecnica/, 2010
y Martínez, <http://www.pmministries.com>, 2010).

2.6 Elaboración de la dosis seminal

Medir el volumen de agua bidestilada (100 ml) (con probeta o balanza) a 37°C y añadir el producto. Mezclar durante 5 minutos de forma manual o con un agitador electromagnético. (Minutube Abfull und Labortechnik GmbH & Co.KG, 2010).

El diluyente debe estar preparado con anterioridad a la colecta de semen con el fin de evitar la mortalidad espermática. (Minutube Abfull und Labortechnik GmbH & Co.KG, 2010).

5.6.1 Cálculo de número dosis seminales.

El objetivo es que cada dosis tenga de 1×10^8 . (Cien millones) de espermatozoides. Tras realizar el examen macroscópico, microscópico, haber obtenido el volumen y la concentración se procedió a calcular el número de dosis posibles a obtener (Calderon *et al*, 1984; Feldman *et al*1987).

$$N \text{ (número de dosis)} = \frac{\text{Concentración (millones de spz./ml) x volumen}}{1 \times 10^8 \text{ spz. (ml)}}$$

Se usó la misma fórmula para cada una de las muestras y a su vez para cada uno de los diluyentes a comparar.

La cantidad necesaria para la inseminación artificial con semen fresco debe ser de 1×10^8 de espermatozoides disueltos en 3 ml; la cantidad necesaria para la inseminación artificial con semen congelado debe ser de 2×10^8 de espermatozoides disueltos en 3 ml. (<http://san-bernardos.es/tiposde.htm> 2010 y Root Margareth, 2005).

2.6.2 Cálculo de la cantidad de diluyente.

Se añadió suavemente el semen sobre el diluyente y homogenizo, antes de mezclar semen y diluyente se comprobó que no existan diferencias de temperatura entre ambos, lo cual se facilito si durante todo el proceso se mantiene atemperado tanto el semen como el diluyente. (Kubus, S.A. 2000).

2.6.3 Envasado de la dosis.

Se envaso las dosis de semen diluido para uso en fresco en jeringas de 3 ml. Las cuales no contiene en su estructura agentes espermicidas, se identifica con un código el cual debe concatenar en el registro con los datos como, la raza, edad, características morfológicas, datos genéticos, datos de camadas, etc.

Se envaso las dosis para semen congelado en jeringas de 3 ml Las cuales no contiene en su estructura agentes espermicidas, se identifica con un código el cual debe concatenar en el registro con los datos como, la raza, edad, características morfológicas, datos genéticos, datos de camadas, etc.

Para que el semen diluido mantenga su capacidad fecundante a lo largo de su almacenamiento, es indispensable cumplir las siguientes condiciones:

- El material que entro en contacto con el semen estaba previamente limpio y esterilizado, sin residuos químicos.
- Se utilizo agua bidestilada que no estaba alterada bioquimicamente ni microbiológicamente.
- Se diluiyo en un periodo inferior a 15 minutos desde la recogida del semen.
- No se expuso a la luz solar directa.

2.7 Conservación de la dilución en fresco

Una vez que se obtuvieron las dosis diluidas con el semen, se procedio a mantener las muestras a una temperatura de entre 15 a 17 °C la cual se le denomina temperatura ambiente, en jeringas dosificadoras herméticamente cerradas, conservándolos en un ambiente anaerobio, protegidos de la luz solar directa, y rayos UV que dañaran la muestra, también se identifico con la fecha de preparación, el código de tratamiento lo que permitió identificar la fecha de caducidad del material.

2.8 Conservación del semen congelado.

La solución que se preparo se mantuvo a baño María a 35° C, y se enfrio en un refrigerador por 2 horas (la temperatura final fue de 4°C) el material se cargo en jeringas de 3 ml y se congelo en vapores de N₂ (Nitrógeno) durante diez minutos, 4 centímetros por encima de la superficie y luego se transfirio al recipiente de LN₂ (Liquid Nitrogen, Nitrógeno Liquido) para su almacenamiento. (Wanke Maria, 2006).

III.-MATERIALES Y MÉTODOS.

3.2 Materiales.

3.1.1 Lugar y Duración del experimento.

La presente investigación se realizó en la ciudad de Quito, parroquia la Magdalena de la Provincia de Pichincha, en la Clínica Veterinaria Los Andes propiedad del Dr. Médico Veterinario y Zootecnista Erick David Chiriboga Pineda.

El trabajo de campo tuvo una duración total de ocho meses incluyó el trabajo de campo, recolección de datos, tabulación e interpretación de la información, redacción del documento de tesis y sustentación.

Cuadro N° 6: Situación geográfica y climática.

PARÁMETROS CLIMATICOS	LA MAGDALENA
Altitud m.s.n.m.	2840
Latitud	0°14'13.68" S
Longitud	78°31'43.63" O
Temperatura	Max. de 23 °C y min. de 8 °C
Temperatura anual	14 °C
Precipitación media anual	500 – 1500 mm
Potencial Evotranspiracion Ratios	0.5-1
Piso de Humedad	Sub Humedo
Heleofania (H/L) año	2104 horas de brillo solar
Humedad relativa (%)	83%

FUENTE: Instituto Nacional de Meteorología e Hidrológica,

Manual Meteorológico, 2011. Google Earth 2010

Zona de Vida.

Según la clasificación Bioclimática de Holdridge publicada por Wikipedia. El sitio experimental se encuentra ubicado en la zona de vida Bosque húmedo Montano Bajo.

La Magdalena es una [parroquia](#) urbana en el norte del sur de la [ciudad de Quito](#), nombrada así por [María Magdalena](#). La parroquia se encuentra al sur de la loma de [El Panecillo](#). Es fundada en 1.577, cuenta con una población de 50.000 habitantes, posee seis colegios, un Centro de Salud el N° 5. ([http://es.wikipedia.org/wiki/La_Magdalena_\(Quito\)](http://es.wikipedia.org/wiki/La_Magdalena_(Quito)), 2010)

Actualmente se encuentran ubicados 4 barrios en la Parroquia La Magdalena, la Hermano Miguel, Yaguachi, Magdalena Alta, La León. Antes de la conquista española y en lo que actualmente es el sur-centro de Quito existió una comunidad ancestral llamada Machangarilla. Pero ese nombre entró en el olvido aproximadamente en 1557 cuando se fundó ahí mismo la parroquia Santa María de la Magdalena. ([http://es.wikipedia.org/wiki/La_Magdalena_\(Quito\)](http://es.wikipedia.org/wiki/La_Magdalena_(Quito)), 2010)

Se estima que en Quito existe un perro por cada 10 habitantes; el Centro de Salud N° 5 calcula que en la parroquia existen aproximadamente 5.000 perros, de los cuales son callejeros un estimado de 750 a 800 perros (aproximadamente el 16%). (<http://www.explored.com.ec/noticias-ecuador/-se-busca-eliminar-30-mil-perros->, 2010.)

3.1.4 Material experimental.

- 8 muestras de semen canino sin diluir de un macho reproductor de raza American Pit Bull Terrier, de línea Blue Nose de 5 años de edad.
- 6 hembras de raza American Pit Bull Terrier con edades comprendidas entre 1 ½ año y 5 años.

La selección de las perras para la inseminación artificial se hizo al azar entre las perras que pertenecen al Club Conciencia Pit Bull Terrier Ecuador (CCPBTE), entre las cuales se hallan registradas un aproximado de 32 hembras, se seleccionaran las que presentaron celo en el transcurso de la fase experimental. Se procederá a crear la historia clínica y los registros de cada una, adjuntando la ficha registro del CCPBTE.

3.1.5 Equipo y Materiales de Laboratorio.

a) Materiales de Laboratorio.

- Microscopio
- Baño María
- Balanza digital.
- Probeta graduada de 500 ml.
- Vaso de precipitación de 100 ml
- Cámara de Neubauer
- Termómetros digitales

- Placas porta y cubre objetos
- pH-metro digital
- Estufa
- Galón de agua bidestilada
- Gasa Hidrófilo 0.60 x 100 mts USP tipo 2
- Algodón Hidrófilo 500 gr.
- Papel toalla 50 mts.
- Frasco de bencilpenicilina liofilizada de 1gr.
- Frasco de estreptomicina. liofilizada de 1gr.
- Pares de guantes de látex blancos talla médium.
- Jeringas BBraun de 3 ml (Embolo Plástico no espermicida)
- Desinfectante Yodo 1 galón.
- Termo de Nitrógeno de 1 Kg
- Nitrógeno Liquido 3kg.

b) Diluyentes.

- Leche descremada UHT 2 lts.
- Tris (hidroximetil)aminometano + ácido cítrico.
- CaninePro 8 sobres de 6.6 gramos. 1kg.
- 24 huevos de gallina de 38 gramos

c) Materiales de Inseminación Artificial.

- Jeringas plásticas de 3 cc. de embolo plástico.

- Catéteres de inseminación #12.
- Crema lubricante azoospermica.
- Pistola universal de Inseminación.
- Fichas de Inseminación.

d) Materiales de Detección de Preñez.

- Ecografo (3.5, 5.0 y 7.5 mhz.).

e) Material de Oficina

- Folders plásticos con hojas formateadas para recolección de datos
- Libretas de apuntes de 100 hojas
- Una cámara fotográfica digital Sony de 8 megapíxeles de 2GB de memoria.
- Una computadora Compaq CQ5115LA Dual-Core 2.5 GHz 450 horas
- Hojas de papel bond tamaño INEN A4
- Una impresora multifunción Epson Stylus PHOTO RX595 6 horas
- Lápices HB,
- Bolígrafos color negro punta media
- Borradores

f) Instalaciones.

- Instalaciones de laboratorio.

El laboratorio tiene un área de 5.50 metros cuadrados de superficie de 2.90 de largo por 1.93 de ancho construido con ladrillo y cubiertos de mampostería, cuenta con un lavabo, conexiones eléctricas y una ventana.

Posee un lavabo de acero inoxidable, que incluye una superficie de escurrido, con conexiones de agua caliente y fría; un baño maría de uso permanente marca Scientific Precisión de acero inoxidable de 18 lts. de capacidad con un rango de 18 – 100°C.

Un baño maría de apoyo marca Memmert modelo Basic de 7 lts. de capacidad, con un rango de temperatura de 5-95°C.

Una estufa de 20 lts. de capacidad de fabricación nacional con rango de temperatura de 25-100°C.

Un microscopio marca Supertek binocular, de 4 objetivos 4X, 10X, 40X 100X, otro marca Unico modelo G304 binocular, de 4 objetivos 4X, 10X, 40X 100X.

Una centrifuga marca Clay Adams, con un lugar fijo 8-Rotor de ángulo de acero inoxidable y 8 puestos intercambiables con cojines para tubos de capacidad de 100 ml. de velocidad ajustable 3.000 10.000 rpm., tiempo de 30 minutos con un temporizador y un freno.

Una balanza digital Lcd, de 5 kg. De capacidad, con una precisión de +/- 1Gr, de calibración automática.

3.2 Métodos en estudio.

Para el presente estudio se utilizaron tres tipos de diluyentes para semen fresco canino.

3.3.1 Factores en estudio.

- 8 muestras para semen fresco canino sin diluir de un reproductor de raza American Pit Bull Terrier, de 5 años de edad en buen estado de salud.
- Evaluación macroscópica y microscópica del material seminal.
- Evaluación de tres diluyentes de semen canino fresco: Leche descremada UHT (Ultra High Temperature / Ultrapasteurizada), Tris (hidroximetil)aminometano + ácido cítrico utilizando; CaninePro.
- La dosis que se utilizaron fueron 100 ml de UHT, 100 ml de Tris + Ácido Cítrico, 6.6 gramos de CaninPro en 100 ml de agua destilada.
- 6 Hembras de raza American Pit Bull Terrier.

3.3.2 Unidades experimentales.

Se utilizaron 8 muestras de semen canino fresco sin diluir; de un perro American Pitbull Terrier de 5 años de edad.

Cada una de las muestras para el estudio se trabajó de la siguiente forma:

MUESTRA 1:

- La muestra de material seminal (sin diluir), se evaluó macroscópicamente a fin de determinar la calidad de la muestra y considerando las siguientes características: color, olor, pH y volumen.
- Se evaluó microscópicamente la muestra seminal a fin de observar la concentración, motilidad en masa, motilidad individual, espermatozoides muertos, anormales y viabilidad, lo que permitió determinar la calidad y conocer el número total de dosis seminales a obtener, cada dosis debía contener 1×10^8 de espermatozoides, cantidad requerida para lograr la fecundación en la perra en celo a través de la inseminación artificial.
- Mediante la cámara de Neubauer, se determinó la concentración espermática (200 a 1.000 millones/ml) y se utilizó una probeta graduada para conocer el volumen del eyaculado (1-40 ml de semen intacto), se procedió a dividir el material seminal en tres porciones iguales.
- La primera porción del material seminal se preparó en el diluyente comercial Canine Pro, se preparó 2 dosis, la una se evaluó al fresco cada 8 horas por 72 horas, y la otra se congeló y se evaluó al cabo de 72hrs.
- La segunda porción del material seminal se diluyó en 6 ml. de Tris (hidroximetil)aminometano + ácido cítrico, se preparó 2 dosis, la una se evaluó al

fresco cada 8 horas por 72 horas, y la otra se congelo y se evaluó al cabo de 72hrs.

- La tercera porción del material seminal se diluyo en 6 ml. del disolvente comercial CaninePro, se preparo 2 dosis, la una se evaluó al fresco cada 8 horas por 72 horas, y la otra se congelo y se evaluó al cabo de 72hrs.

Las restantes siete muestras seminales se sometieron a un procedimiento similar.

Se seleccionaron las muestras que presentaron mayor viabilidad y se procedio a la inseminación de las hembras que se hallaron en celo, para lo cual se procedio a realizar una prueba citológica en laboratorio.

3.3.3 Tratamiento y Diseño experimental.

Cuadro N° 7: Esquema de los tratamientos.

DILUYENTES	TRATAMIENTOS	CODIGO	TUE	Observación/ tratamiento
Leche UHT	T1	T1UHT	1	8
Tris	T2	T2TRIS	1	8
CaninePro	T0	T0DSD	1	8
TOTAL				24

Fuente: Propio de los autores 2.010

Momento de la inseminación

La inseminación se realizó 48 horas posterior a que el resultado de la citología vaginal presente células predominantemente poliédricas.

Cuadro N° 8: Esquema del experimento.

TRATAMIENTOS	DILUYENTES	# DE REPETICIONES	TUE
T1	Leche UHT	8	1
T2	Tris	8	1
T0	CaninePro	8	1
TOTAL		24	

Fuente: Propio de los autores 2.010

c) Tipo de análisis.

- Diseño completamente al azar.
- Tres tratamientos en estudio T1, T2, T0.
- 8 repeticiones por tratamiento.
- Total 24 repeticiones.
- 6 Inseminaciones Artificiales.

Cuadro N° 9: Análisis de varianza (ADEVA) en el laboratorio.

Fuentes de variación	Grados de libertad	SC	CM	F.CAL	T	
					5%	1%
Total	23					
Tratamientos	2					
Error experimental	21					

Fuente: Propia de los autores 2.010

Prueba de DUNCAN, para la separación de medias, niveles de significancia ($P > 0.05$).

3.4 Métodos de evaluación y datos tomados.

En el estudio se considero el análisis y valoración de tres variables relacionadas; el semen sometido a dilución, semen diluido fresco y semen diluido congelado.

3.3.1 Variables a estudiar en el semen canino sometido a dilución.

Cuadro N° 10: Variables-Unidad de medida

VARIBLES	UNIDADES DE MEDIDA		
ESTUDIO MACROSCOPICO			
Volumen Colectado	ml		
Color	Blanco lechoso	Crema lechoso	
Olor	Suigeneris		
pH	Acido	Neutro	Básico
ESTUDIO MICROSCOPICO			
Concentración espermática del semen	% concentración (millones/ml)		
Motilidad en masa	Remolino Rápido (75-100)	Remolinos Lentos (50-75)	
	Oscilantes (25-50)	Vibración (0-25)	
Motilidad individual	Remolino Rápido (75-100)	Remolino Moderado (50-75)	
	Lento (25-50)	Muy Lento (0-25)	
Espermatozoides vivos	Porcentaje		
Espermatozoides muertos	Porcentaje		
Espermatozoides anormales	Porcentaje		

Fuente: Propia de los autores 2.010

Fundamentos del estudio:

El estudio se valoro si el eyaculado seminal tiene un volumen apropiado, un color y olor característico de la especie de la que se ha extraído, pero además comprobo si está libre de materiales extraños como sangre o pus que aparte de dañar al espermatozoide nos indica alguna otra anomalía o enfermedad del perro.

De otro lado se determino la calidad y el buen estado del espermatozoide; con esta información valiosa se dispuso de los datos numéricos para calcular el número de dosis seminales y la cantidad de diluyente a prepararse.

3.3.2 Variables a Estudiar en el Semen Canino Diluido Fresco

Cuadro N° 11: Variables Estudio microscópico

VARIBLES	UNIDADES DE MEDIDA	
Concentración espermática del semen	% concentración (millones/ml)	
Motilidad individual	Remolino Rápido (75-100)	Remolino Moderado (50-75)
	Lento (25-50)	Muy Lento (0-25)
Espermatozoides vivos	Porcentaje	
Espermatozoides muertos	Porcentaje	

Fuente: Propio de los autores 2.010

Se determino la calidad del diluyente utilizado, evaluando el estado en el que se encontraron los espermatozoides dentro de esta solución, aportando datos para realizar un posterior análisis y determinar si es factible su utilización en la inseminación artificial canina.

3.3.3 Variables a Estudiar en el Semen Canino Diluido Congelado

Cuadro N° 12: Variables Estudio microscópico

VARIBLES	UNIDADES DE MEDIDA	
Concentración espermática del semen	% concentración (millones/ml)	
Motilidad individual	Remolino Rápido (75-100)	Remolino Moderado (50-75)
	Lento (25-50)	Muy Lento (0-25)
Espermatozoides vivos	Porcentaje	
Espermatozoides muertos	Porcentaje	
Espermatozoides anormales	Porcentaje	

Fuente: Propia de los autores 2.010

Se determino la calidad del diluyente utilizado, evaluando el estado en el que se encuentren los espermatozoides dentro de esta solución, apporto datos para realizar un posterior análisis y determinar si es factible su utilización en la inseminación artificial canina.

3.3.4 Variables a Estudiar en las perras inseminadas.

Cuadro N° 13: Variables en perras inseminadas

MEDIDA	INDICADORES ESPECÍFICOS	
Concepción	$C = \text{perras gestantes} / \text{perras inseminadas} \times 100$	Porcentaje

Fuente: Propia de los autores 2.010

3.4 Manejo del Experimento.

Para el presente estudio se procedio de la siguiente manera:

- Selección del macho
 - Se utilizo un macho raza American Pitbull Terrier de 5 años de edad, de excelentes actitudes heredables, el cual presenta una mejora fenotípica en su progenie que haciende a aproximadamente al 78% de heredabilidad.
 - Al ingreso a la clínica como reproductor se procedio a abrir la historia clínica (CVA.1011.117), y a realizar un chequeo general de salud, se procede a realizar exámenes de sangre, orina y heces, en el cual se constata su estado de salud.
 - Se procedio a desparasitar con albendazol vía oral, y se administra un complejo vitamínico vía parenteral.
 - Se procedio al refuerzo anual de vacunación con vacuna séxtuple.

3.4.7 Procedimiento de Extracción de Semen

- La recolección de semen se la hizo en horas de la mañana (09:00 a.m.), ya que el organismo se halla en homeostasia, estado que se consigue por el periodo de descanso y los parámetros espermáticos son los más óptimos.

- Se procedió a la limpieza del área genital haciendo especial énfasis en el área prepucial, se uso germidal (base agua al 1%), con el fin de evitar agentes que contaminen la muestra espermática.
- Se seco el área con toallas desechables de alta densidad por su mejor absorción.
- Se subió al perro a la mesa auxiliar de laboratorio.
- El técnico se colocó un par de guantes desechables de látex.
- El técnico procedió a provocar la erección del miembro masculino del animal; y, produciera la eyaculación y la colecta del material seminal en un termo.

3.4.8 Procedimiento de Laboratorio

a) Examen Macroscópico.

Una vez completa la recolección del material seminal se realizó la evaluación del volumen, color, olor y pH para determinar la calidad del material.

Para obtener el volumen del eyaculado, se empleó una probeta graduada de 100 ml (temperada con anterioridad a 37°C para evitar el shock térmico). (Cyocel 2010; Wanke Maria 2006; y Root Margareth 2005)

El volumen de eyaculación está entre 1 a 40 ml dependiendo de la edad, raza, tamaño testicular, estado fisiológico, ritmo de colecta. (Cyocel 2010; Wanke Maria 2006; y Root Margareth 2005)

La coloración seminal aceptada es de cualquier tonalidad en blanco. La tonalidad rojiza indica la presencia de sangre, ya sea de la superficie peneana o la próstata, la tonalidad amarilla indica residuos de orina y el hallazgo de partículas blancas señala la presencia de leucocitos, eritrocitos u otras células en el eyaculado. (Wanke Maria 2006; y Root Margareth 2005).

La percepción del olor se obtuvo mediante el olfato, se hizo énfasis en percibir olores fuera de lo normal.

El pH se determinó mediante un pH-metro digital, la medida aceptable es en variaciones cercanas al neutro (6.3 a 7.4) la variación extrema de estos son causa para desechar el eyaculado. (Wanke Maria 2006; y Root Margareth 2005)

b) Examen microscópico.

Este tipo de examen es necesario puesto que determino la calidad y estado del espermatozoide y nos proporciono datos para calcular el número de dosis y la cantidad de diluyente a preparar.

Motilidad en masa: para calcular este parámetro se colocó una gota de eyaculado fresco en una placa portaobjetos previamente atemperada a 37° C, se extendió la muestra y se observó al microscopio con el lente de menor aumento (10 X), la calidad del movimiento se calificó en una escala de 0 - 100%.

El porcentaje aceptable de motilidad progresiva en los espermatozoides caninos es del 70 % o superior. (Wanke Maria 2006; y Root Margareth 2005)

Motilidad Individual: para calcular este parámetro se colocó una gota de eyaculado fresco en una placa portaobjetos previamente atemperada a 37° C, y se observó al microscopio con el lente de mayor aumento (40 X), se evaluó la motilidad en una escala de 0 - 100 %

El porcentaje aceptable de motilidad progresiva en los espermatozoides caninos es del 70 % o superior. (Esquivel, *et al* 2008)

Cuadro N° 14: Modo de clasificación de 0 -100 % para motilidad en masa y individual.

Calificación	Movimiento en masa.	Movimiento individual.
Muy buena (75 -100%)	Remolino Rápido	Remolino Rápido
Buena (50 -75%)	Remolinos Lentos	Remolino Moderado
Regular (25 -50%)	Oscilantes	Lento
Mala (0 – 25)	Vibración	Muy Lento

Fuente: Camacho, 2000

La calificación (75 a 100%), se da al movimiento en masa que muestren remolinos rápidos deben ser corrientes turbulentas o vertiginosas que se mueven muy

rápidamente; mientras en el movimiento individual se identifica los espermatozoides con mayor movimiento rápido y vigoroso.

La calificación (50 a 75%), se observa al movimiento en masa, remolinos lentos, con ondas o con movimiento retardado; mientras en el movimiento individual se identifica los espermatozoides en movimiento moderado lento.

La calificación (25 a 50%), el movimiento en masa los espermatozoides oscilan, movimientos singulares o esporádicos o no hay al parecer ninguna actividad de masa, en movimiento individual efectúan movimientos de vaivén a la manera de un péndulo o de un cuerpo colgado.

La calificación (0 a 25%), en movimiento en masa los espermatozoides se observa una vibración o ningún movimiento perceptible, en motilidad individual puede existir un movimiento muy leve o se observa espermatozoides con inmovilidad total o necrospermia.

Concentración: es el número de espermatozoides por ml. de semen. El número de espermatozoides en el eyaculado se determina multiplicando la concentración por el volumen total colectado.

Los espermatozoides se cuentan con la ayuda de la cámara Neubauer.

En una pipeta se hará la dilución de solución salina al 2.9 % de 1:100, después se llena la cámara Neubauer y se contabiliza los espermatozoides de los cuadros de los extremos y centro de cada cámara. La cámara Neubauer tiene 2 cámaras, por lo tanto, se conto cinco cuadros en cada cámara, se sumaron los resultados de las dos cámaras

y se dividió entre dos para sacar el promedio y el resultado (número de espermatozoides) se multiplica por 5×10^6 según el factor de dilución (1:100 es por 5×10^6), obteniéndose así la concentración espermática por ml. de eyaculado. Se multiplico la concentración obtenida en cada ml., por el volumen colectado; dando como resultado el número de espermatozoides total por eyaculado.

En un eyaculado normal existen en promedio de 200 a 1000 millones de espermatozoides por mililitro y por lo menos 100 millones son necesarios para gestar una perra, siempre y cuando se insemine con semen fresco. Cuando el semen es congelado la concentración espermática debe ser mayor debido a la muerte de espermatozoides ocasionada por los procesos de congelamiento y descongelamiento . (Esquivel,2006).

La concentración puede variar dependiendo de la edad, actividad sexual y época del año.

Morfología: Con el propósito de evaluar la morfología del espermatozoide, a una muestra de semen se le tiñó para observar las anormalidades espermáticas presentes. Se realiza en una gota de semen, a la que se le agregó una gota de eosina - nigrosina y se hizo un extendido; posteriormente se le puso un cubreobjetos y se observó al microscopio. (Root Margareth, 2005; Rolf *et al*, 2007).

También se pueden utilizar tinciones como Wright, Giemsa y tinta china, pero se

obtiene una menor calidad de imagen (contraste) en comparación con la eosina - nigrosina. (Root Margareth, 2005)

Las anomalías del espermatozoide se clasifican en primarias y secundarias, conforme al sitio donde se localiza el defecto. (Root Margareth, 2005; Rolf *et al*, 2007).

Un perro normal debe tener un 80 % de espermatozoides normales y un máximo de 20 % de espermatozoides anormales (Root Margareth, 2005; Rolf *et al*, 1984).

Los espermatozoides vivos no presentan coloración, mientras que los muertos se tiñen de rojo, debido a la pasividad de sus membranas, al penetrar la eosina.

c) Cálculo de número dosis.

El objetivo es que cada dosis tenga de 1×10^8 . (Cien millones) de espermatozoides. Tras realizar el examen macroscópico y microscópico, haber obtenido el volumen y la concentración se procedió a calcular el número de dosis posibles a obtener (Calderon *et al*, 2007; Feldman *et al* 2001).

$$N (\text{número de dosis}) = \frac{\text{Concentración (millones de spz./ml) x volumen}}{1 \times 10^8 \text{ spz. (ml)}}$$

Se uso la misma fórmula para cada una de las muestras y a su vez para cada uno de los diluyentes a comparar.

La cantidad necesaria para la inseminación artificial con semen fresco fue de 1×10^8 de espermatozoides disueltos en 3 ml; la cantidad necesaria para la inseminación artificial con semen congelado debe ser de 2×10^8 de espermatozoides disueltos en 3 ml. (<http://san-bernardos.es/tiposde.htm> 2010 y Root Margareth, 2005;).

d) Preparación del semen diluido fresco.

Fue importante tener listo los diluyentes antes de extraer la muestra de semen sin diluir, con el fin de tener atemperado en baño María a 37°C , tanto el diluyente como la muestra de semen y evitamos un shock térmico de los espermatozoides al momento de la dilución.

- **Preparación del diluyente CaninePro.**

Procedimiento:

- En un vaso de precipitación de 100 ml de capacidad de vidrio pyrex, se agrego 100 ml de agua bidestilada estéril.
- Se añadió 6.6 gr del diluyente CaninePro, contenido en un sobre comercial. (MINITUBE. 2010. Abfull und Labortechnik GmbH & Co.KG. Mode d'emploi – Canine-Pro)

- La solución que se preparo se mantiene a baño María a 37° C, hasta que se realizo la dilución.

- **Preparación del diluyente Tris (hidroximetil)aminometano + acido cítrico.**

Procedimiento:

- En un vaso de precipitación de 100 ml de capacidad de vidrio pyrex, se agrego c.s.p 100 ml de agua bidestilada estéril.
- Se añadió 3.025 gramos de Tris, 1.7 gramos de Acido cítrico, 1.25 gramos de fructosa, 0.1 gramos de estreptomina, 0.06 gramos de bencilpenicilina, 20% de yema de huevo y se homogenizo la solución. (Wanke Maria 2006, Baquero, et al 2004)
- La solución que se preparo se mantiuvo a baño María a 37° C, hasta realizar la dilución.

- **Preparación del diluyente Leche descremada UHT.**

Procedimiento:

- En un vaso de precipitación de 100 ml de capacidad de vidrio pyrex, se agrego c.s.p 100 ml de agua bidestilada estéril.
- Se añadió 4 ml de leche UHT, 0.05 gramos de estreptomina, 0.05 gramos de bencilpenicilina, 20% de yema de huevo y se homogenizo la solución. (Sánchez, et al 2006; Baquero, et al 2004 y Sánchez et al 2001)

- La solución que se preparo se mantubo a baño María a 37° C, hasta realizar la dilución.

- **Conservación de la dilución en fresco**

- Una vez que se obtuvieron las dosis diluidas con el semen, se procedio a mantener las muestras a una temperatura de entre 15 a 17 °C la cual se le denomina temperatura ambiente, en jeringas de 3 ml herméticamente cerradas, se conservo en un ambiente anaerobio la cual no posee espacio libre y protegidos de la luz solar directa, y rayos UV que dañan la muestra.
- También se identifico con la fecha de preparación, el código de tratamiento lo que permitió identificar la fecha de caducidad del material.

- **Evaluación de la dilución seminal.**

- La evaluación de la viabilidad espermática en los diferentes tratamientos, se realizo mediante los siguientes parámetros: químico (pH), microscópico (motilidad espermática, mortalidad espermática, vitalidad espermática).
- La evaluación se los hizo cada 12 horas por un periodo de 72 horas.

e) Preparación del semen congelado.

- **Preparación del diluyente CaninePro**

Procedimiento:

- En un vaso de precipitación de 100 ml de capacidad de vidrio pyrex, se agregó 100 ml de agua bidestilada estéril.
- Se añadió 6.6 gr del diluyente CaninePro, contenido en un sobre comercial. (MINITUBE. 2010. Abfull und Labortechnik GmbH & Co.KG. Mode d'emploi – Canine-Pro)
- La solución que se preparó se mantuvo a baño María a 35° C, y se enfrió en el refrigerador por 2 horas (la temperatura final es de 4°C). (Wanke María 2006)
- El material se cargó en pajuelas medianas y se congeló en vapores de N₂ (Nitrógeno) durante diez minutos, 4 centímetros por encima de la superficie. (Wanke María 2006)
- Luego se transfirió al recipiente de LN₂ (Liquid Nitrogen, Nitrógeno Líquido) para su almacenamiento. (Wanke María 2006)

- **Preparación del diluyente Tris (hidroximetil)aminometano + ácido cítrico.**

Procedimiento:

- En un vaso de precipitación de 100 ml de capacidad de vidrio pyrex, se colocó c.s.p. 100 ml de agua bidestilada 100 ml de agua bidestilada estéril.

- Se añadió 3.025 gramos de Tris, 1.7 gramos de Acido cítrico, 1.25 gramos de fructosa, 0.1 gramos de estreptomicina, 0.06 gramos de bencilpenicilina, 20% de yema de huevo, 16 ml de glicerol.
- La solución que se preparo se mantubo a baño María a 35° C, y se mantuvo en un refrigerador por 2 horas (la temperatura final es de 4°C). (Wanke Maria 2006)
- El material se cargo en pajuelas medianas y se congelo en vapores de N₂ (Nitrógeno) durante diez minutos, 4 centímetros por encima de la superficie. (Wanke María 2006)
- Luego se transfirió al recipiente de LN₂ (Liquid Nitrogen, Nitrógeno Liquido) para su almacenamiento. (Wanke María 2006)

- **Preparación del diluyente Leche descremada UHT.**

Procedimiento:

- En un vaso de precipitación de 100 ml de capacidad de vidrio pyrex, se colocó c.s.p. 100 ml de agua bidestilada 100 ml de agua bidestilada estéril.
- Se añadió, 4 ml de leche UHT, 0.05 gramos de estreptomicina, 0.05 gramos de bencilpenicilina, 20% de yema de huevo, 16 ml de glicerol.
- La solución que se preparo se mantuvo a baño María a 35° C, y se mantuvo en un refrigerador por 2 horas (la temperatura final es de 4°C). (Wanke Maria 2006)
- El material se cargo en pajuelas medianas y se congelo en vapores de N₂ (Nitrógeno) durante diez minutos, 4 centímetros por encima de la superficie. (Wanke Maria 2006)

- Luego se transfirió al recipiente de LN₂ (Liquid Nitrogen, Nitrógeno Líquido) para su almacenamiento. (Wanke Maria 2006)

3.4.9 Evaluación de la dilución seminal.

- La evaluación de la viabilidad espermática en los diferentes tratamientos, se realizó mediante los siguientes parámetros: químico (pH), microscópico (motilidad espermática, mortalidad espermática, vitalidad espermática).
- Esto se lo hizo a las 72 horas, para lo cual se procedió a descongelar el semen en baño maría a 70°C durante 8 segundos.

3.4.10 Preparación de las perras para la inseminación artificial.

- Tras la selección de las hembras, se procedió a la apertura de Historias clínicas, para proceder a la desparasitación con albendazol y a la administración de thormangan (para regularizar la función ovárica).
- Una vez presentado el celo se hicieron citologías vaginales a partir del día 13 al 15.
- Cuando se presentó persistencia de células poligonales se determinó la inseminación en las próximas 48 horas.

3.4.11 Inseminación en las perras

- Se limpio la región bulbar con clorhexidina al 10%.
- El ayudante tomo la hembra y levanto el tren posterior en 45°,
- El operario alisto la dosis seminal y procedió a realizar la relación catéter – útero.
- Se procedió a la introducción del catéter hasta el útero.
- Se impulso la dosis con la jeringuilla que posee la dosis seminal, a un ritmo constante y de velocidad moderada.
- Se desconecto el catéter de la jeringa y se procedió a la introducción de aire, acompañado de la extracción simultanea del catéter.

3.4.12 Detección de la Preñez

- Se espero 18 días post-inseminación, y se procedió a la detección de preñez usando el ecografo, con el cual se identificaron las membranas fetales.

IV.- RESULTADOS Y DISCUSION

Al concluir la presente investigación, cuya finalidad fue evaluar el comportamiento de diluyentes alternos como la leche UHT y el TRIS frente a un diluyente comercial como el Dog Semen Diluent, utilizados para la dilución de material seminal de perros se llegó a los siguientes resultados.

4.1 Determinación de medidas de tendencia central y variación en las características que identifican al semen antes de la dilución.

La finalidad de este análisis fue determinar las buenas condiciones de cada una de las muestras y del material seminal sin diluir, y el comportamiento frente al empleo de los diluyentes.

Cuadro N° 15: Resultado de la evaluación de semen canino antes de diluir

Muestra	Evaluación macroscópica				Evaluación microscópica							
	Volumen ml _g	Color	Olor	pH	Concentración espermática (millones spz/ml)	Motilidad en Masa	Motilidad Individual	Vitalidad Espermática	Mortalidad espermática	Normalidad espermática	Anormalidad	
1	9.6	BlLe	SG	7.1	950	85	75	95	5	98	2	
2	11.0	BlLe	SG	6.8	895	90	85	96	4	99	1	
3	103	BlLe	SG	7.0	950	85	85	95	5	99	1	
4	9.7	BlLe	SG	6.9	900	80	75	97	3	98	2	
5	10.1	BlLe	SG	7.0	930	895	80	97	3	99	1	
6	9.7	BlLe	SG	7.1	980	95	90	98	2	98	2	
7	10.4	BlLe	SG	6.8	901	85	80	90	10	99	1	
8	10.2	BlLe	SG	6.9	950	95	90	92	8	98	2	
X	10.125			6.95	932.0	87.5	82.5	95.0	5.0	98.5	1.5	
S	0.465			0.120	30.785	5.345	5.976	2.726	2.726	0.535	0.535	
S _x	0.164			0.042	10.884	1.890	2.113	0.964	0.964	0.189	0.189	
CV %	0.216			0.014	947.714	28.571	35.714	7.429	7.429	0.286	0.286	

Bl. Le.= Blanco Lechoso

X = Media

S_x= Error estándar

Fuente: Propio de los autores (2011).

SG = sui generis

S= Desviación estándar

CV= Coeficiente de Variación

Como se aprecia en el Cuadro N°15; al realizar los análisis estadísticos correspondientes a las medidas de tendencia central y dispersión para el total de muestras extraídas se puede anotar que:

En la evaluación macroscópica el promedio de semen extraído para diluir en cuanto a volumen fue de 10.13 ml; el potencial hidrógeno de 6.95; las muestras presentaron un color blanco lechoso y un olor sui generis.

Las muestras sometidas a evaluación microscópica, en promedio, presentaron una concentración espermática de 932 millones de espermatozoides por ml de semen, una motilidad en masa promedio de 87.5%; una motilidad individual de 82.5%, una vitalidad espermática de 95%; una mortalidad espermática de 5%; la normalidad espermática de 98.5% y 1.5% en anormalidades.

El coeficiente de variación (CV) para todas las muestras extraídas fue aceptable, pues la variación de una muestra a otra es mínima., lo que nos permitió trabajar en este tipo de investigación,

Estos parámetros a los que fueron sometidas determinan que las colectas extraídas fueron de buena calidad por lo tanto se pudieron emplear para las diluciones, y obtener nuevas dosis, se sometieron a las evaluaciones cada ocho horas por el periodo de 72 horas.

Según Wanke, (2006), el volumen de eyaculado medio de un perro varía de 2.5 a 80 ml según la edad, raza, estado fisiológico y ritmo de colecta del animal, aspecto que coincide con los resultados alcanzados en nuestra investigación ya que el promedio de colecta seminal fue de 10.13 ml.

Wanke (2006) enuncia que, un eyaculado canino posee un pH 6,3 a 7,1 valor que coincidió con el de nuestras muestras extraídas, ya que alcanzaron un pH promedio de 6.95.

Además Root (2006) manifiesta que el color del eyaculado canino puede presentar variaciones de colores desde gris transparente hasta blanco lechoso, y nuestras muestras presentaron un color blanco lechoso.

El olor del semen es sui géneris o característico, propiedad que se presentaron en las muestras seminales colectadas para nuestra investigación (www.fcm.org.mx/invest/; 2010)

Según Esquivel (2006), la concentración espermática es de 200 a 1000 millones de espermatozoides por mililitro, este porcentaje coincidió con la concentración espermática de las muestras extraídas para nuestro estudio fue de 932 de Spz/ml.

Según Wanke (2006), en referencia a la motilidad en masa manifiesta que debe existir una motilidad en masa >80% y que se acepta una motilidad individual de > 80%;

parámetros que coincidieron con las muestras extraídas, con una motilidad en masa promedio de 87.5% y una motilidad individual de 82.5%.

La Federación Canófila Mexicana determinó que un eyaculado normal debe contener por lo menos 90% de espermatozoides vivos y una media del 10% de espermatozoides muertos, nuestras muestras presentaron 95% de vitalidad y 5% de mortalidad, ajustándose a los parámetros requeridos.

Manifiesta Esquivel, (2006), la concentración espermática es de 200 a 1000 millones por ml, este porcentaje coincide con la concentración espermática de las muestras extraídas en nuestro estudio que fue de 210 millones de Spz/ml.

4.2 Análisis de Varianza, discusión y prueba de DUNCAN AL 5% de los resultados observados en los diluyentes por 72 horas en semen diluido fresco.

1. Potencial de Hidrogeno

El fundamento de la prueba fue demostrar la capacidad que tienen los diluyentes de mantener el potencial de hidrogeno en neutro y así mantener la viabilidad espermática, este parámetro se midió con un pH-metro digital, y se tuvo el apoyo de tiras medidoras de pH.

1.1 Análisis de varianza ADEVA en bloques completamente al azar para la variable potencial hidrogeno en semen fresco y prueba de DUNCAN 5%.

Cuadro N° 16: Análisis de varianza ADEVA para la variable pH.

	8 H.	16 H.	24 H.	32 H.	40 H.	48 H.	56 H.	64 H.	72 H.
Prob.	0.1474 NS	0.1931 NS	0.0000 **						
C.V.	0.60	3.01	2.41	2.53	3.37	3.27	3.08	3.13	3.62
X	7.025	6.987	6.858	6.850	6.775	6.729	6.721	6.596	6.642

**Altamente significativo; * Significativo y NS no significativa

Fuente: Propio de los autores (2011)

Al realizar el Análisis de Varianza según se observa en el Cuadro N° 16, la variable potencial hidrogeno para evaluar los tres tipos de diluyentes utilizados, en muestras de semen, se demostró que:

- Las muestras a las 8 y las 16 horas presentaron una diferencia no significativa entre los tratamientos de 0.1474 y 0.1931 respectivamente.
- Las muestras desde las 24 hasta las 72 horas presentaron una probabilidad altamente significativa de 0.0000 en todas las muestras.
- El coeficiente de variación de las muestras de semen diluido fue de 0.60%, en 8 horas hasta el 3.62% en las 72 horas; lo que demuestra que no hay alteración de pH de una muestra a otra.
- El promedio del pH de las muestras de semen diluido fue de 6.80.

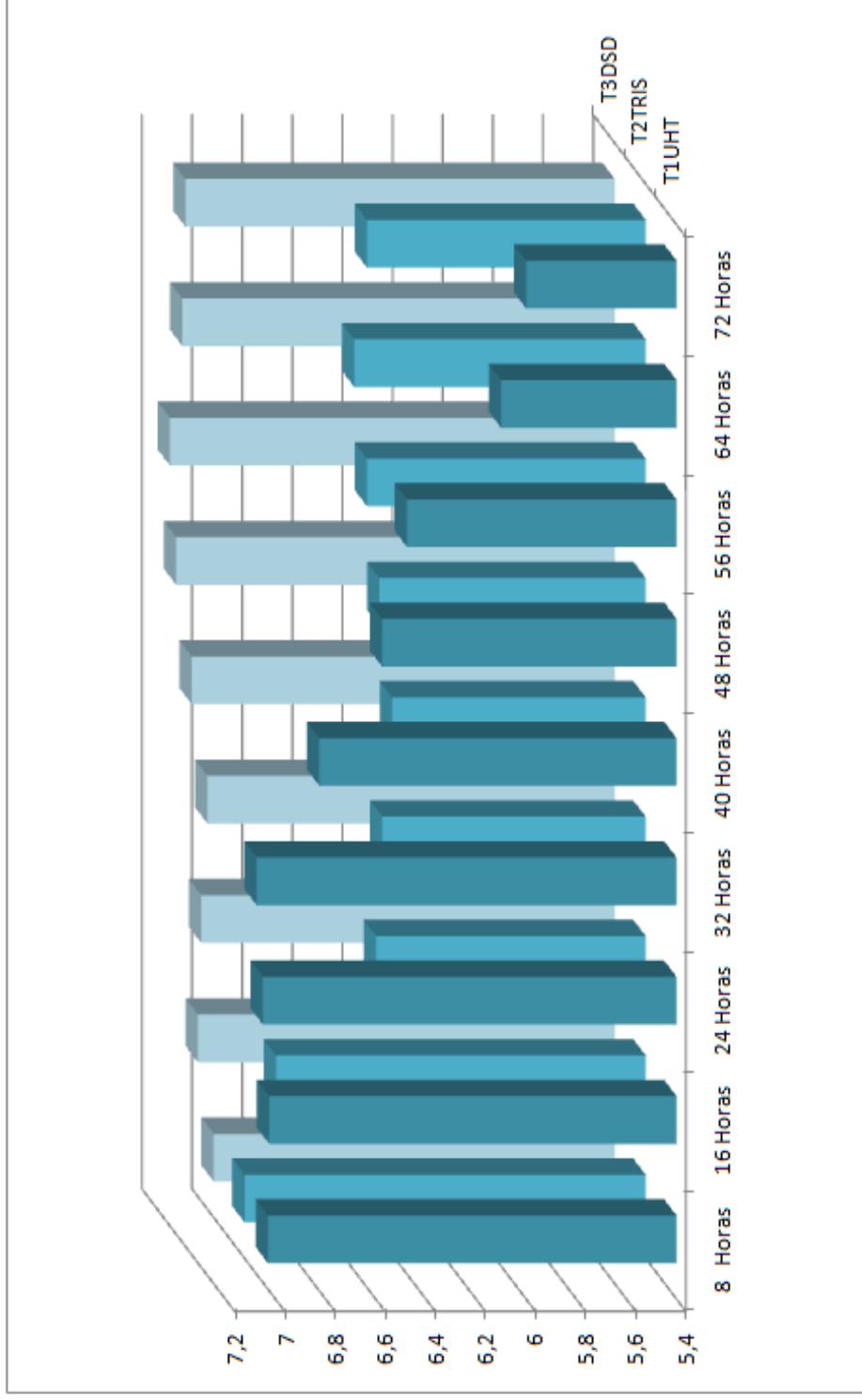
Según Esquivel (2007) el pH óptimo para una buena viabilidad espermática debe ser de 6.3 a 7.2, coincidiendo con el promedio del pH obtenido (6.80) en esta investigación; valor que demostró que la dilución al cabo de las 72 horas está dentro del parámetro establecido como aceptable al haberlo comparado con el eyaculado normal, esto ya que en todos los diluyentes se priorizó el uso de tampones de pH, con lo cual se logró el cometido y se viabilizó las muestras.

Cuadro N°17: Prueba de Duncan al 5% en la variable pH.

TRATAMIENTOS	8 Horas		16 Horas		24 Horas		32 Horas		40 Horas		48 Horas		56 Horas		64 Horas		72 Horas	
	Promedio	R. Significación																
T1UHHT	7.037	A	7.025	A	7.050	A	7.075	A	6.825	AB	6.575	A	6.475	A	6.100	A	6.000	A
T2TRIS	7.00	A	6.875	A	6.475	B	6.450	B	6.412	B	6.463	B	6.512	B	6.563	B	6.512	B
T3DSD	7.00	A	7.063	A	7.050	A	7.025	A	7.088	A	7.150	B	7.125	B	6.100	C	7.113	C

Fuente: Propio de los autores (2011)

Grafico N°3: Promedio de pH.



Fuente: Propia de los autores (2011).

Como se puede observar en el cuadro N° 17 y en el grafico N°3 al realizar la prueba de Duncan al 5% en la variable pH para evaluar los tres tipos de diluyentes utilizados, en muestras de semen, se determino que:

- Para determinar cuál es el mejor diluyente para semen canino existió tres rangos de significancia, (A), (B) y (C) en la cual se encuentra los diluyentes, UHT, TRIS, DSD, con un promedio general de 6.73.

En la prueba de Duncan al 5% para la variable de pH al cabo de las 72 horas se demostró que a pesar que existio variación significativa en los rangos de pH no existió ninguna muestra que sea desechada.

Según Esquivel (2007), el cual enuncia que la muestra de semen tiene que tener un pH de 6.3 a 7.1, valor que es aceptable para la conservación del esperma. Los tratamientos realizados presentaron un pH idóneo lo que aseguro la viabilidad espermática, pero hay que resaltar que el tratamiento con leche semidescremada UHT (T1UHT) presento un pH promedio de 6.89; en tanto que el Tris hidroximetilaminometano (T2TRIS) mostro una media de pH de 6.59; y el Dog Semen Diluent (T3DSD) con un cociente de 6.95; de lo que se desprendió que la muestra comercial Dog Semen Duiluent es la que presento el pH más estable durante las 72 horas de experimentación, en tanto el Tris al cabo de las 24 horas presento una leve disminución, pero no fue concluyente para desechar las muestras; mientras que la leche descremada UHT mantuvo una estabilidad relativa hasta las 48 horas; a partir

de esto empezó una caída sostenida de pH, obligando a descartar las muestras de la hora 64 y 72, como manifiesta Esquivel (2007).

2. Motilidad Espermática

Es un parámetro importante en la evaluación de la calidad de semen canino y debe ser superior al 70% en una muestra normal, este parámetro indica la habilidad de los espermatozoides para alcanzar al óvulo y fertilizarlo y deberá evaluarse a 37°C. (Esquivel *et al*; 2007 y Wanke María, 2006).

2.1 Análisis de varianza ADEVA en bloques completamente al azar para la variable motilidad en semen fresco y prueba de DUNCAN 5%.

Cuadro N° 18: Análisis de varianza ADEVA para la variable motilidad.

	8 H.	16 H.	24 H.	32 H.	40 H.	48 H.	56 H.	64 H.	72 H.
Prob.	0.1216 NS	0.2537 NS	0.0218 NS	0.0958 NS	0.0000 **	0.0000 **	0.0000 **	0.0000 **	0.0000 **
C.V.	1.58	1.19	2.59	2.11	2.46	4.12	3.36	3.36	4.39
X	84.583	84.750	81.833	80.167	78.333	76.792	74.083	73.292	71.000

**Altamente significativo; * Significativo y NS no significativa

Fuente: Propio de los autores (2011)

Al realizar el Análisis de Varianza según se observa en el Cuadro N° 18, la variable motilidad para evaluar los tres tipos de diluyentes utilizados, en muestras de semen, se demostró que:

- Las muestras desde las 8 hasta las 32 horas presentaron una diferencia no significativa entre los tratamientos de 0.1216 a 0.0958 respectivamente.
- Las muestras desde las 40 hasta las 72 horas presentaron una probabilidad altamente significativa de 0.0000 en todas las muestras.
- El coeficiente de variación de las muestras de semen diluido fue de 1.58%, en 8 horas hasta el 4.39% en las 72 horas; lo que demuestra una alta variación de una muestra a otra.
- El promedio de la motilidad de las muestras de semen diluido fue de 78.315% en general.

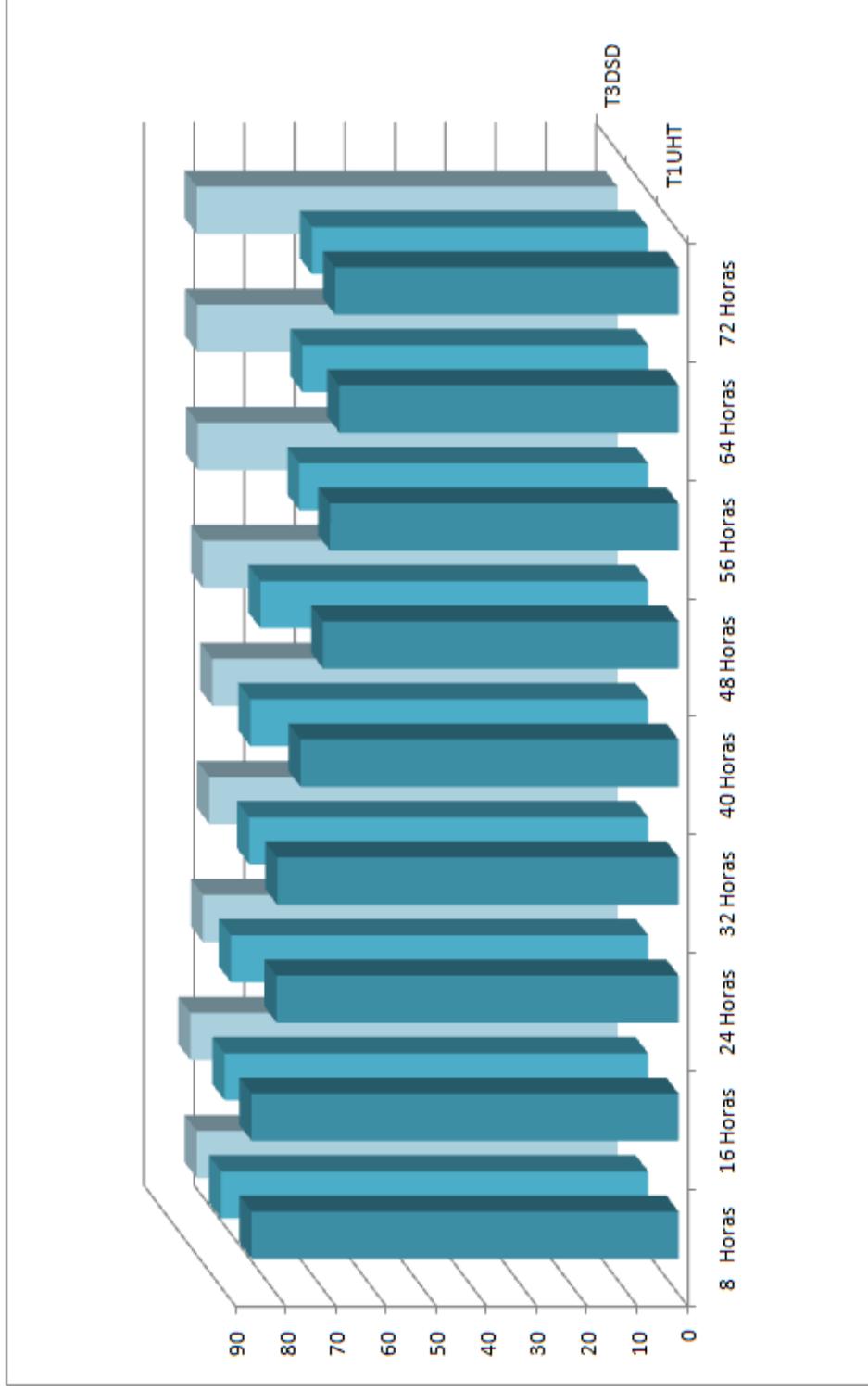
Según manifiesta Esquivel (2007) la motilidad óptima para una buena viabilidad espermática debe ser superior al 70%, coincidiendo con el promedio obtenido (78.315%) en esta investigación, valor que demostró que en la dilución la mortalidad a las 72 horas esta dentro del parámetro establecido como aceptable al compararlo con el eyaculado normal.

Cuadro N° 19: Prueba de Duncan al 5% en la variable motilidad.

TRATAMIENTOS	8 Horas		16 Horas		24 Horas		32 Horas		40 Horas		48 Horas		56 Horas		64 Horas		72 Horas	
	Promedio	R. Significación																
T1UHIT	85.00	A	85.00	A	80.00	A	79.88	A	75.25	B	70.75	B	69.38	B	67.50	B	62.38	B
T2TRIS	85.00	A	84.25	A	83.00	A	79.38	A	79.13	A B	77.13	A B	69.38	B	68.75	B	66.88	B
T3DSD	83.75	A	85.00	A	82.50	A	81.25	A	80.63	A	82.50	A	83.50	A	83.63	A	83.75	A

Fuente: Propio de los autores (2011)

Gráfico N°4: Promedio de motilidad.



Fuente: Propia de los autores (2011).

Como se puede observar en el cuadro N° 19 y en el grafico N°4 al realizar la prueba de Duncan al 5% en la variable motilidad para evaluar los tres tipos de diluyentes utilizados, en muestras de semen, se demostró que:

- Para determinar cuál es el mejor diluyente para semen canino existió dos rangos de significancia, (A) y (B); en la cual se encuentra los diluyentes, UHT, TRIS, DSD, con un promedio general de 78.54.

Wanke (2007) manifiesta que una muestra debe tener una motilidad superior al 70% para calificar como aceptable de lo que quedo demostrado que los tratamientos con leche semidescremada UHT (T1UHT) presentaron una motilidad promedio de 75.68%; en tanto que el Tris hidroximetilaminometano (T2TRIS) mostro una media de pH de 76,98%; y el Dog Semen Diluent (T3DSD) con un cociente de 82.95; de lo que se puede anotar que la muestra comercial Dog Semen Duiluent es la que presento la motilidad más estable durante las 72 horas de experimentación, mientras el Tris presento viabilidad aceptable hasta las 48 horas, teniendo que ser desechadas las siguientes muestras, esto por el desgaste continuado de azucares en el disolvente; la leche descremada UHT mantiene una motilidad hasta las 48 horas, desechando las otras muestras, pero cabe resaltar que la disminución es constante debido al consumo de azucares lo que no permitió mantener la motilidad continua.

3. Mortalidad Espermática

Según la Federación Canofila Mexicana la mortalidad espermática no debe ser mayor al 10% y si rebasara este valor no es de buena calidad y por lo tanto no debe ser utilizado. Para poder calificar este parámetro de una muestra de semen se toma una gota, a la que se le agrega una gota de eosina - nigrosina y se hace un extendido; posteriormente se le pone un cubreobjetos y se observa al microscopio un número de 100 espermatozoides en 4 campos distintos los espermatozoides vivos no presentan coloración mientras que los muertos se tiñen de rojo debido a la pasividad de sus membranas, al penetrar la eosina, la nigrosina tan solo sirve de contraste quedando depositado en el fondo del portaobjetos (Esquivel *et al*, 2007; Root Margareth, 2005 y Rillo *et al*, 2001).

3.1 Análisis de varianza ADEVA en bloques completamente al azar para la variable mortalidad en semen fresco y prueba de DUNCAN 5%.

Cuadro N° 20: Análisis de varianza ADEVA para la variable mortalidad

	8 H.	16 H.	24 H.	32 H.	40 H.	48 H.	56 H.	64 H.	72 H.
Probabilidad	0.3323	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
	NS	**	**	**	**	**	**	**	**
C.V.	23.08	16.45	26.77	20.50	17.85	11.11	15.60	12.72	11.33
X	5.125	7.417	13.000	16.958	18.000	22.833	23.792	26.958	31.000

**Altamente significativo; * Significativo y NS no significativa

Fuente: Propio de los autores (2011)

Al realizar el Análisis de Varianza según se observa en el Cuadro N° 20, la variable mortalidad para evaluar los tres tipos de diluyentes utilizados, en muestras de semen, se demostró que:

- Las muestras a las 8 horas presentaron una diferencia no significativa entre los tratamientos de 0.3323.
- Las muestras desde las 16 hasta las 72 horas presentaron una probabilidad altamente significativa de 0.0000 en todas las muestras.
- El coeficiente de variación de las muestras de semen diluido fue de 23.08%, en 8 horas hasta el 11.33% en las 72 horas; lo que demuestra una alta variación de una muestra a otra.
- El promedio de la mortalidad de las muestras de semen diluido fue de 18.34% en general.

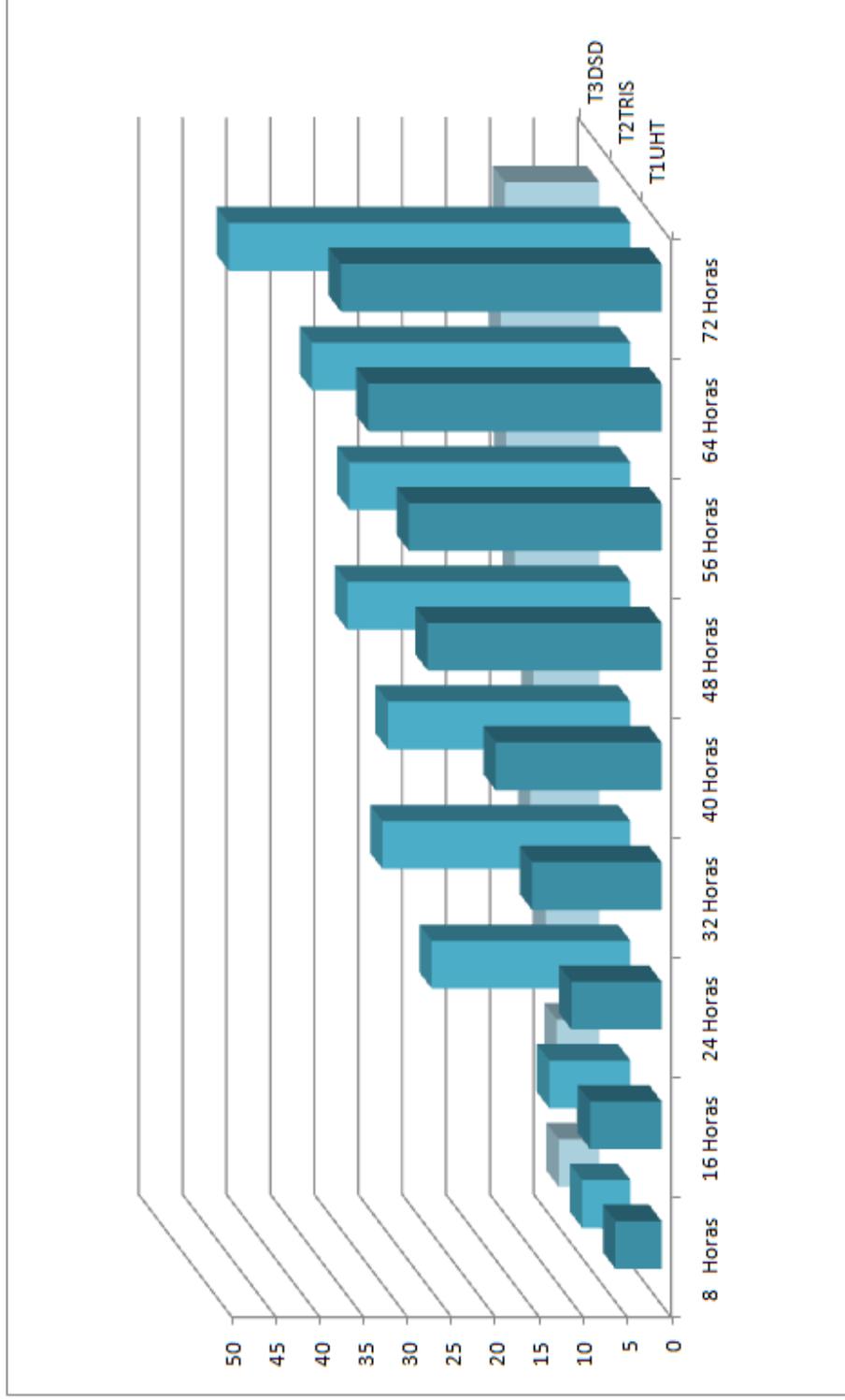
Según la Federación Canofila Mexicana (2010) la mortalidad espermática no debe ser mayor al 10% y si rebaza este valor no es de buena calidad y por lo tanto no debe ser utilizado; nuestras muestras presentaron una mortalidad promedio del 18.34%; de lo que se puede detallar que hasta las 16 horas las muestras son viables de ahí en adelante fueron desechadas como menciona la FCM.

Cuadro N°21: Prueba de Duncan al 5% en la variable mortalidad.

TRATAMIENTOS	8 Horas		16 Horas		24 Horas		32 Horas		40 Horas		48 Horas		56 Horas		64 Horas		72 Horas	
	Promedio	R. Significación																
T1UHIT	5.250	A	8.125	A	10.25	A	14.75	B	18.88	B	26.63	B	28.75	A	33.38	A	36.50	B
T2TRIS	5.50	A	9.250	A	22.63	A	28.25	A	27.63	A	32.25	A	32.00	A	36.25	A	45.75	A
T3DSD	4.625	A	4.875	B	6.125	A	7.875	B	7.50	C	9.625	C	10.63	B	11.25	B	10.75	C

Fuente: Propio de los autores (2011)

Gráfico N°5: Promedio de mortalidad.



Fuente: Propia de los autores (2011).

Como se puede observar en el cuadro N° 21 y en el grafico N°5 al realizar la prueba de Duncan al 5% en la variable mortalidad para evaluar los tres tipos de diluyentes utilizados, en muestras de semen, se demostró que:

- Para establecer cuál es el mejor diluyente para semen canino existieron tres rangos de significancia, (A), (B) y (C); en la cual se encuentra los diluyentes, UHT, TRIS, DSD, con un promedio general de mortalidad de 18.34%.

Según la Federación Canofila Mexicana la mortalidad espermática no debe ser mayor al 10% y si rebaza este valor no es de buena calidad y por lo tanto no debe ser utilizado; de lo que quedo demostrado que los tratamientos con leche semidescremada UHT (T1UHT) presento una mortalidad promedio de 20.28%; en tanto que el Tris hidroximetilaminometano (T2TRIS) mostro una media de pH de 26.61%; y el Dog Semen Diluent (T3DSD) con un cociente de 8.13; asi queda anotado que la muestra comercial Dog Semen Duiluent es la que presento la mortalidad más baja durante las 72 horas de experimentación, calificando a las muestras como aceptables hasta las 48 horas post dilución, las subsiguientes fueron desechadas; el Tris presento una mortalidad aceptable hasta las 16 horas, considerando las muestras como aceptables y teniendo que ser desechadas las siguientes muestras, debido a que presentaron una elevación abrupta de la motilidad; de 9.25% a las 16 horas hasta 22.63% en la hora 24 mantuvieron esta tendencia hasta alcanzar 45.75% a las 72 horas; en tanto la leche descremada UHT mantuvo una mortalidad aceptable hasta las 16 horas con un 8.125%, desechando las otras

muestras, pero cabe resaltar que el aumento de la mortalidad fue moderado, y mantuvo una tendencia fija ya que a las 24 horas la mortalidad fue apenas del 10.25% siendo eliminada tan solo por una diferencia de 0.25% de lo que enuncia la Federación Canofila Mexicana y a las 72 horas la mortalidad alcanza el 36.50%.

4. Vitalidad Espermática

La vitalidad espermática permite evaluar el porcentaje de espermatozoides vivos que contiene una muestra de semen, diferenciando así los espermatozoides inmóviles de los muertos. Cuando una célula muere, se vuelve permeable y puede absorber colorantes vitales, lo que nos permite visualizarla con un determinado color. Después de realizar la tinción de vitalidad, los espermatozoides vivos no habrán absorbido el colorante mientras que los muertos sí. La visualización al microscopio nos permite diferenciar entre espermatozoides teñidos y no teñidos. (<http://seminogramas.com/>, 2010)

4.1 Análisis de varianza ADEVA en bloques completamente al azar para la variable Vitalidad en semen fresco y prueba de DUNCAN 5%.

Cuadro N° 22: Análisis de varianza ADEVA para la variable Vitalidad.

	8 H.	16 H.	24 H.	32 H.	40 H.	48 H.	56 H.	64 H.	72 H.
Prob.	0.3553	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
	NS	**	**	**	**	**	**	**	**
C.V.	1.29	1.23	3.80	3.40	3.80	3.27	5.41	4.60	7.00
X	94.875	92.583	87.208	82.542	81.875	77.125	76.333	72.792	69.708

**Altamente significativo; * Significativo y NS no significativa

Fuente: Propio de los autores (2011)

Al realizar el Análisis de Varianza según se observa en el Cuadro N° 22, la variable vitalidad para evaluar los tres tipos de diluyentes utilizados, en muestras de semen, se demostró que:

- Las muestras a las 8 horas presentaron una diferencia no significativa entre los tratamientos de 0.3553.
- Las muestras desde las 16 hasta las 72 horas presentaron una probabilidad altamente significativa de 0.0000 en todas las muestras.
- El coeficiente de variación de las muestras de semen diluido fue de 1.29%, en 8 horas hasta el 7.00% en las 72 horas; lo que demuestra una alta variación de una muestra a otra.

- El promedio de la vitalidad de las muestras de semen diluido fue de 81.67% en general.

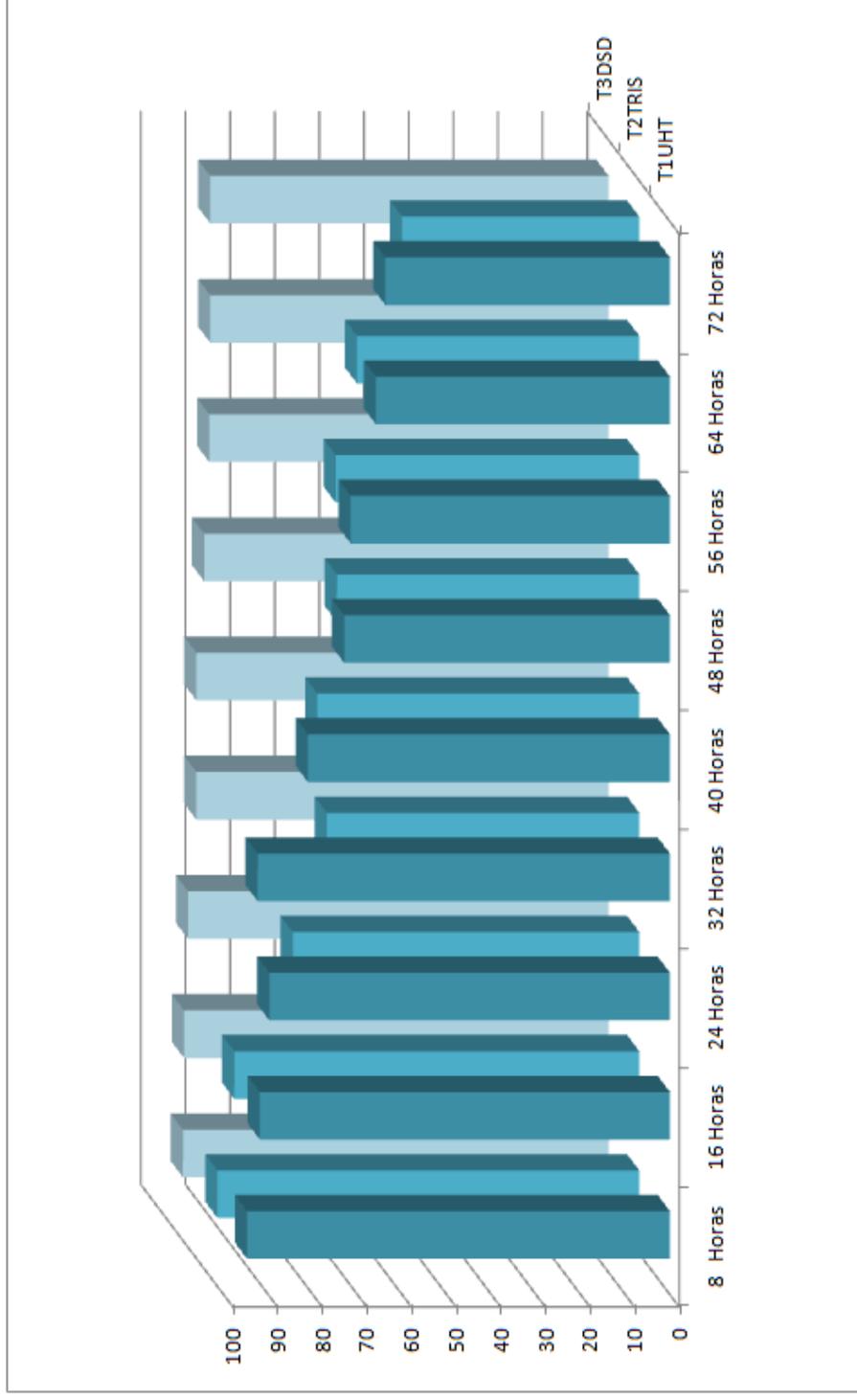
Según Root (2006) la vitalidad espermática no debe ser inferior al 90% para poder emplear la muestra si el valor es inferior se desecha la muestra; nuestras muestras presentaron una mortalidad promedio del 81.67%. Lo que se puede detallar es que hasta las 16 horas las muestras son viables de ahí en adelante fueron excluidas por presentar una vitalidad disminuida.

Cuadro N°23: Prueba de Duncan al 5% en la variable vitalidad.

TRATAMIENTOS	8 Horas		16 Horas		24 Horas		32 Horas		40 Horas		48 Horas		56 Horas		64 Horas		72 Horas	
	Promedio	R. Significación																
T1UHTT	94.75	A	91.88	B	89.75	A	92.38	B	81.13	B	73.00	B	71.50	B	65.88	B	63.75	B
T2TRIS	94.50	A	90.75	B	77.63	B	70.00	C	72.13	C	67.75	B	68.00	B	63.25	B	53.13	B
T3DSD	95.38	A	95.13	A	94.25	A	92.38	A	92.38	A	90.63	A	89.50	A	89.25	A	89.25	A

Fuente: Propio de los autores (2011)

Gráfico N°6: Promedio de vitalidad.



Fuente: Propia de los autores (2011).

Como se puede observar en el cuadro N° 23 y en el grafico N°6 al realizar la prueba de Duncan al 5% en la variable mortalidad para evaluar los tres tipos de diluyentes utilizados, en muestras de semen, se demostró que:

- Para establecer cuál es el mejor diluyente para semen canino existieron tres rangos de significancia, (A), (B) y (C); en la cual se encuentra los diluyentes, UHT, TRIS, DSD, con un promedio general de vitalidad de 81,83%

Según Root (2006) la vitalidad espermática no debe ser inferior al 90% para poder emplear la muestra si el valor es inferior se desecha la muestra; de lo que quedo demostrado que los tratamientos con leche semidescremada UHT (T1UHT) presento una vitalidad promedio de 80.44%; en tanto que el Tris hidroximetil aminometano (T2TRIS) mostro una media de pH de 73.01%; y el Dog Semen Diluent (T3DSD) con un cociente de 92.01; así se destaco que la muestra comercial Dog Semen Diluent es la que presento la vitalidad más alta durante las 72 horas de experimentación, calificando a las muestras como viables hasta las 48 horas post dilución en y las subsiguientes se desecharon; el Tris presento una vitalidad aceptable hasta las 16 horas, considerando las muestras como aceptables y teniendo que ser rechazadas las siguientes muestras, debido a que presentaron una disminución abismal de la vitalidad; de 90.75% a las 16 horas hasta 77.63% en la hora 24 manteniendo esta tendencia hasta alcanzar 53.13% a las 72 horas; en tanto la leche descremada UHT mantuvo una buena vitalidad hasta las 16 horas con un 91.88%, desechando las otras muestras, pero cabe resaltar que la disminución de la vitalidad

fue moderada, y mantuvo una tendencia a bajar fija ya que a las 24 horas la vitalidad era apenas del 89.75% siendo eliminada tan solo por una diferencia de 0.25% de lo que enuncia Root (2007) como aceptable, pero la muestra a las 32 horas presento una vitalidad de 92.38% de lo que se dedujo que dicho diluyente presento viabilidad de la muestra hasta las 32 horas post dilución.

4.3 Análisis de Varianza, discusión y prueba de DUNCAN AL 5% de los resultados observados en 72 horas en semen diluido congelado.

1. Potencial de Hidrogeno

El fundamento de la prueba es demostrar la capacidad que tienen los diluyentes de mantener el potencial de hidrogeno en neutro y así mantener la viabilidad espermática, este parámetro se medirá con un pH-metro digital, y se tendrá de apoyo tiras medidoras de pH.

1.1 Análisis de varianza ADEVA en bloques completamente al azar para la variable potencial hidrogeno a las 72 horas post-dilución en semen congelado y prueba de DUNCAN 5%.

Cuadro N° 24: Análisis de varianza ADEVA para la variable pH a las 72 horas.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F.tab	Probabilidad
Total	23	5.230			
Tratamientos	2	4.216	2.108	43.666	0.0000 **
Error experimental	21	1.014	0.048		
C.V. %	3.38				
Promedio	6.496				

**Altamente significativo; * Significativo y NS no significativa

Fuente: Propio de los autores (2011)

Al realizar el Análisis de Varianza según se observa en el Cuadro N° 24, la variable potencial hidrogeno para evaluar los tres tipos de diluyentes utilizados, en muestras de semen, se determinó que:

- Las muestras a las 72 horas presentan una diferencia altamente significativa entre los tratamientos de 0.000.
- El coeficiente de variación de las muestras de semen diluido es de 3.38%.
- El promedio del pH de las muestras de semen diluido es de 6.496.

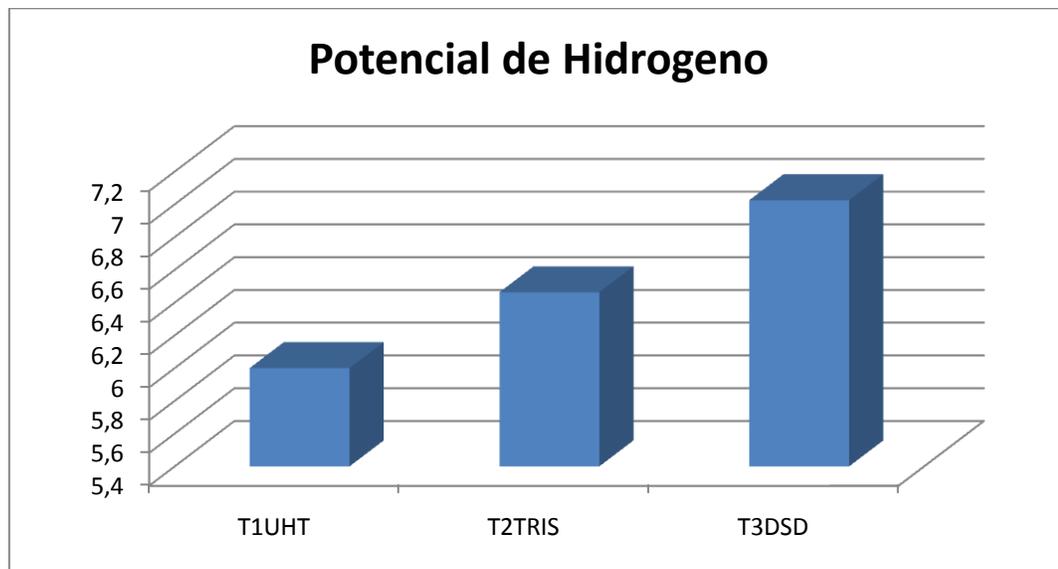
Según Root (2007) el pH óptimo para una buena viabilidad debe tener valores entre 6.3 y 7.1, lo que demuestra que la dilución y descongelación a las 72 horas se mantiene dentro del parámetro normal (6.45) para mantener la viabilidad espermática.

Cuadro N° 25: Prueba de Duncan al 5% en la variable pH a las 72 horas.

Orden descendente		
Tratamientos	Promedios	Rango de significación
T3DSD	7.025	A
T2TRIS	6.463	B
T1UHT	6.000	B

Fuente: Propio de los autores (2011)

Grafico N° 7: Promedio de pH a las 72 horas post dilución en semen congelado



Fuente: Propio de los autores (2011)

Como se puede observar en el cuadro N°25 y en el grafico N° 7 al realizar la prueba de Duncan al 5% en la variable pH para evaluar los tres tipos de diluyentes utilizados, en muestras de semen, se determinó que:

- Para determinar cuál es el mejor diluyente para semen canino existió dos rangos de significancia; en A en la cual se encuentra el diluyente DSD con un valor de 7.025 y en B con TRIS y el UHT con un valor promedio de 6.23.

En la prueba de Duncan al 5% para la variable de pH a las 72 horas las muestras de semen canino diluidas y descongeladas presentaron dos rangos de; en A en la cual se encuentra el diluyente DSD con un valor de 7.025 y en B con TRIS y el UHT con un valor promedio de 6.23, de esto podemos acotar que el rango A en el cual está el DSD fue aceptable, el rango B fue desechado; pero cabe anotar que el diluyente TRIS si se ajusto a lo anotado Esquivel, por lo tanto es aceptable.

2. Motilidad Espermática

Es un parámetro importante en la evaluación de la calidad de semen canino y debe ser superior al 70% en una muestra normal, este parámetro indica la habilidad de los espermatozoides para alcanzar al óvulo y fertilizarlo. y deberá evaluarse a 37°C. (Esquivel *et al*; 2007 y Wanke María, 2006).

2.1 Análisis de varianza ADEVA en bloques completamente al azar para la variable motilidad a las 72 horas post-dilución en semen congelado y prueba de DUNCAN 5%.

Cuadro N° 26: Análisis de varianza ADEVA para la variable motilidad a las 72 horas.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F. tab	Probabilidad
Total	23	1729.333			
Tratamientos	2	1668.083	834.042	285.957	0.0000 **
Error experimental	21	61.250	2.917		
C.V. %	2.43				
Promedio	70.167				

**Altamente significativo; * Significativo y NS no significativa

Fuente: Propio de los autores (2011)

Al realizar el Análisis de Varianza según se observa en el Cuadro N° 26, la variable motilidad para evaluar los tres tipos de diluyentes utilizados, en muestras de semen, se determino que:

- Las muestras a las 72 horas presentan una diferencia altamente significativa entre los tratamientos de 0.000.
- El coeficiente de variación de las muestras de semen diluido es de 2.43%.
- El promedio de motilidad en las muestras de semen diluido es de 70.167.

Según Wanke (2006) el parámetro de motilidad debe ser superior al 70% en una muestra normal para una buena viabilidad fecundante, lo que demuestra que a las 72

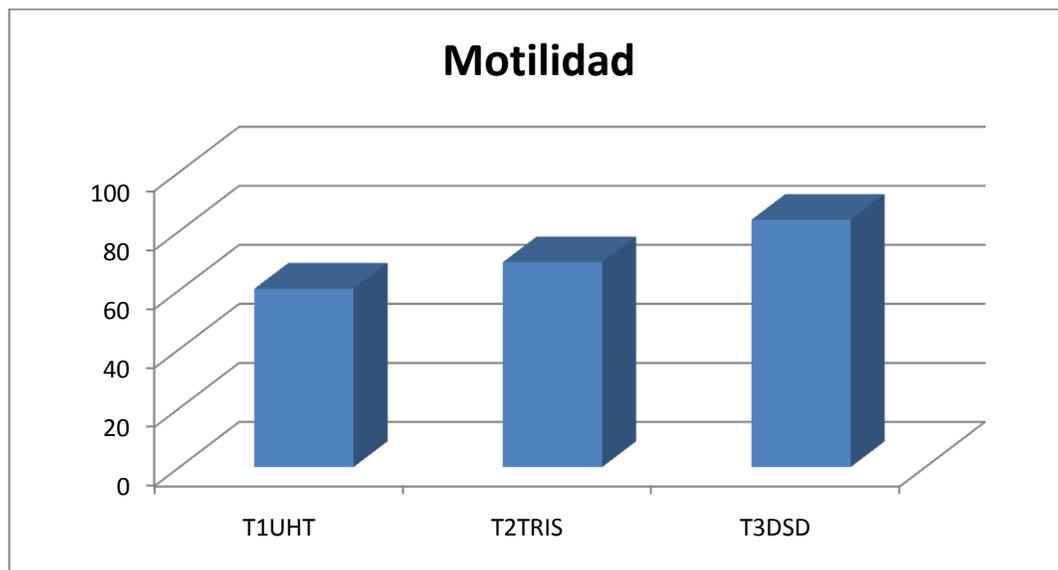
horas post dilución y descongelación nuestros valores se ajustan por lo que serán del parámetro normal para mantener la viabilidad espermática.

Cuadro N° 27: Prueba de Duncan al 5% en la variable motilidad a las 72 horas.

Orden descendente		
Tratamientos	Promedios	Rango de significación
T3DSD	80.75	A
T2TRIS	69.38	B
T1UHT	60.38	C

Fuente: Propio de los autores (2011)

Grafico N° 8: Promedio de motilidad a las 72 horas post dilución en semen congelado



Fuente: Propio de los autores (2011)

Como se puede observar en el cuadro N° 27 y en el grafico N°8 al realizar la prueba de Duncan al 5% en la variable motilidad para evaluar los tres tipos de diluyentes utilizados, en muestras de semen, se determino que:

- Para determinar cuál es el mejor diluyente para semen canino existió tres rangos de significancia; en A en la cual se encuentra el diluyente DSD con un valor de 80.75, en B con TRIS con 69.38 y en C el UHT con un valor promedio de 60.38, de esto podemos acotar que el rango A en el cual está el DSD es aceptable en tanto que el rango B y el C debería ser desechado de acuerdo a lo anotado Esquivel (2006)

3. Mortalidad Espermática

Según la Federación Canofila Mexicana la mortalidad espermática no debe ser mayor al 10% y si rebaza este valor no es de buena calidad y por lo tanto no debe ser utilizado. Para poder calificar este parámetro de una muestra de semen se toma una gota, a la que se le agrega una gota de eosina - nigrosina y se hace un extendido; posteriormente se le pone un cubreobjetos y se observa al microscopio un número de 100 espermatozoides en 4 campos distintos los espermatozoides vivos no presentan coloración mientras que los muertos se tiñen de rojo debido a la pasividad de sus membranas, al penetrar la eosina, la nigrosina tan solo sirve de contraste quedando depositado en el fondo del portaobjetos (Esquivel *et al*, 2007; Root Margareth, 2005 y Rillo *et al*, 2001).

3.1 Análisis de varianza ADEVA en bloques completamente al azar para la variable mortalidad a las 72 horas post-dilución en semen congelado y prueba de DUNCAN 5%.

Cuadro N° 28: Análisis de varianza ADEVA para la variable mortalidad a las 72 horas.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F. tab	Probabilidad
Total	23	489.833			
Tratamientos	2	436.583	218.292	86.087	0.0000**
Error experimental	21	53.250	2.536		
C.V. %	3.94				
Promedio	40.417				

**Altamente significativo; * Significativo y NS no significativa

Fuente: Propio de los autores (2011)

Al realizar el Análisis de Varianza según se observa en el Cuadro N° 28, la variable motilidad para evaluar los tres tipos de diluyentes utilizados, en muestras de semen, se determino que:

- Las muestras a las 72 horas presentan una diferencia altamente significativa entre los tratamientos de 0.000.
- El coeficiente de variación de las muestras de semen diluido es de 3.94%.
- El promedio de mortalidad en las muestras de semen diluido es de 40.417.

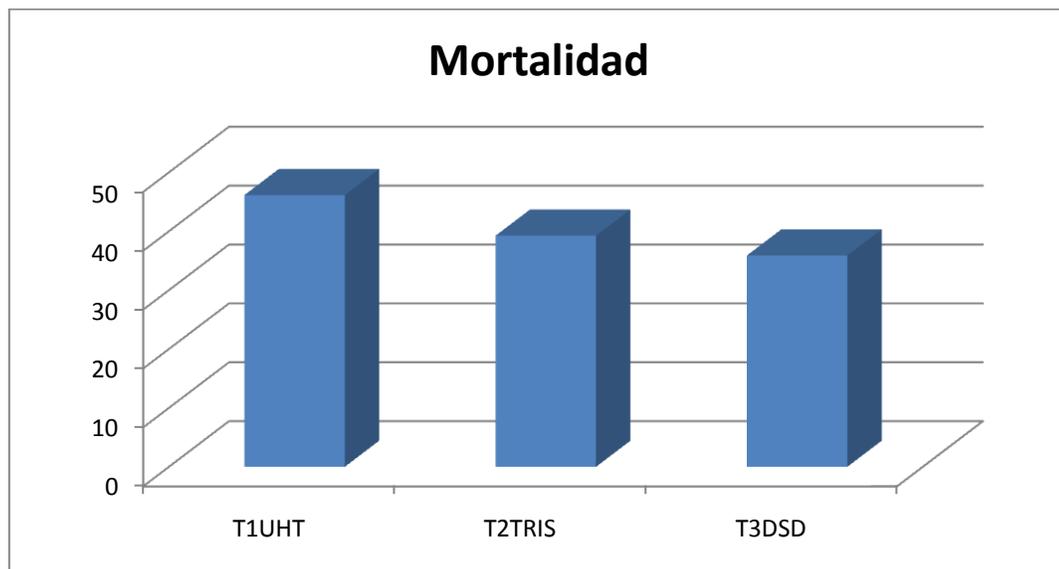
Según Wanke (2006) el parámetro de mortalidad debe ser inferior al 10% en una muestra normal para una buena viabilidad fecundante, lo que demuestra que a las 72 horas post dilución y descongelación nuestros resultados han sobrepasado este valor y las muestras no son de buena calidad por lo tanto deben ser desechadas.

Cuadro N° 29: Prueba de Duncan al 5% en la variable mortalidad a las 72 horas.

Orden descendente		
Tratamientos	Promedios	Rango de significación
T1UHT	46.13	A
T2TRIS	39.25	B
T3DSD	35.88	B

Fuente: Propio de los autores (2011)

Grafico N° 9: Promedio de mortalidad a las 72 horas post dilución en semen congelado



Fuente: Propio de los autores (2011)

Como se puede observar en el cuadro N° 29 y en el grafico N° 9 al realizar la prueba de Duncan al 5% en la variable Mortalidad para evaluar los tres tipos de diluyentes utilizados, en muestras de semen, se determinó que:

- Para determinar cuál es el mejor diluyente para semen canino existió dos rangos de significancia; en A en la cual se encuentra el diluyente DSD con un valor de 46.13, en B con TRIS y UHT con valor promedio de 37.57, de esto podemos demarcar que tanto el rango A como el B fueron desechados de acuerdo a lo anotado Esquivel (2007), el cual da un valor no mayor al 10%

4. Vitalidad Espermática

La vitalidad espermática permite evaluar el porcentaje de espermatozoides vivos que contiene una muestra de semen, diferenciando así los espermatozoides inmóviles de los muertos. Cuando una célula muere, se vuelve permeable y puede absorber colorantes vitales, lo que nos permite visualizarla con un determinado color. Después de realizar la tinción de vitalidad, los espermatozoides vivos no habrán absorbido el colorante mientras que los muertos sí. La visualización al microscopio nos permite diferenciar entre espermatozoides teñidos y no teñidos.

(<http://seminogramas.com/fertilidad/andrologia/test-vitalidad-espermatoca.html>)

4.1 Análisis de varianza ADEVA en bloques completamente al azar para la variable Vitalidad a las 72 horas post-dilución en semen congelado y prueba de DUNCAN 5%.

Cuadro N° 30: Análisis de varianza ADEVA para la variable Vitalidad a las 72 horas.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F. tab	Probabilidad
Total	23	499.958			
Tratamientos	2	448.083	224.042	90.696	0.0000**
Error experimental	21	51.875	2.470		
C.V. %	2.64				
Promedio	59.542				

**Altamente significativo; * Significativo y NS no significativa

Fuente: Propio de los autores (2011)

Al realizar el Análisis de Varianza según se observa en el Cuadro N° 30, de la variable vitalidad para evaluar los tres tipos de diluyentes utilizados, en muestras de semen, se determino que:

- Las muestras a las 72 horas presentan una diferencia altamente significativa entre los tratamientos de 0.0000.
- El coeficiente de variación de las muestras de semen diluido es de 2.64%.
- El promedio de motilidad de las muestras de semen diluido es de 59.542 %.

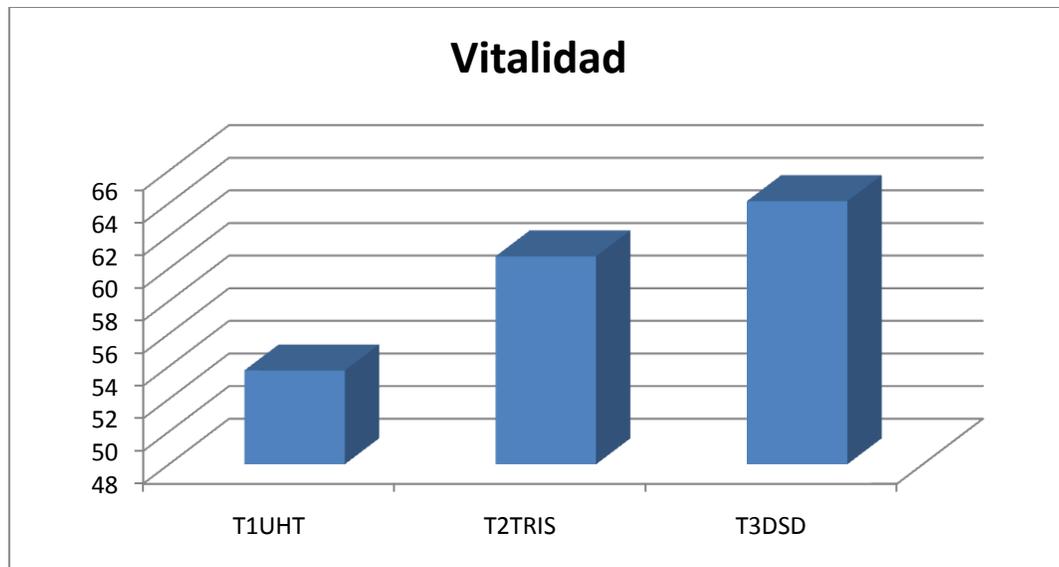
Según expresa Root (2007) las muestras serán desechadas por no ajustarse a los requisitos mínimos de vitalidad la cual los ubica en el 90%, y nuestras muestras están en un promedio de 59.54%.

Cuadro N° 31: Prueba de Duncan al 5% en la variable vitalidad a las 72 horas.

Orden descendente		
Tratamientos	Promedios	Rango de significación
T3DSD	64.13	A
T2TRIS	60.75	A
T1UHT	53.75	B

Fuente: Propio de los autores (2011)

Gráfico N° 10: Promedio de vitalidad a las 72 horas post dilución en semen congelado



Fuente: Propio de los autores (2011)

Como se puede observar en el cuadro N° 31 y en el grafico N° 10 al realizar la prueba de Duncan al 5% en la variable vitalidad para evaluar los tres tipos de diluyentes utilizados, en muestras de semen, se concluye que:

- Para determinar cuál es el mejor diluyente para semen canino existió dos rangos de significación; A en el cual está el DSD y el TRIS con un promedio de 62.44% y B con el UHT con un valor de 53.75 %, con lo que los dos rangos son desechables por no mantener la vitalidad mínima.

4.4 Análisis de costos por dosis.

La finalidad de este análisis es determinar el costo de cada una de las dosis.

Para realizar el análisis de costos se ha dividido en:

- **Costos fijos de los equipos:** Son valores que manejamos tras la depreciación del tiempo de uso durante el experimento.
- **Costos variables:** Son valores que incluyen insumos de laboratorio para la preparación de los diluyentes, mano de obra y servicios básicos.
- **Costo total de la producción** de las dosis de semen diluido en cada uno de los diluyentes: Es el valor neto que se obtiene tras la suma de valores fijos de los equipos, mas los costos variables, y dividida para el numero de muestras, dando como resultado el valor final por dosis.

4.4.1 Costos fijos de los equipos de laboratorio

Cuadro N° 32: Costos fijos de los equipos de laboratorio

Detalle	Unidad	Valor inicial \$	Vida útil años	Depreciación anual \$	Depreciación diaria \$	Depreciación periodo \$
Microscopio	1	600,00	5	480,00	0.66	60,00
Baño María	1	900,00	5	216,00	0,37	33.30
Cámara de neubauer	1	45,00	1	45,00	0,18	1.66
Termómetro	2	10	1	10	0,04	3.60
TOTAL (A)		1555.00		751.00		60.00

Fuente: Propio de los autores (2011)

4.4.2. Costos por dosis de semen canino producida con el empleo del diluyente leche UHT

Cuadro N° 33: Costos por dosis de semen canino producida con el empleo del diluyente leche UHT

Detalle	Unidad	Cantidad	Valor Unidad	Valor Total
1. DILUYENTE				
Leche UHT	litro	1	0.75	1,60
Estreptomicina	frasco	1	3.25	3.25
Bencilpenicilina	frasco	1	3.80	3.80
Huevos	unidades	8	0.15	1.20
2. MATERIAL DE LABORATORIO				
Eosina	frasco	1	5,00	5,00
Nigrosina	frasco	1	45,00	45,00
Vaso de precipitación	unidades	1	6,00	6,00
Pipeta	unidades	1	7.80	7.80
Placas porta y cubre	unidades	50	0.08	4.00
3. MANO DE OBRA TÉCNICOS				
Mano de obra	unidades	1	260,00	260
4. SERVICIOS BÁSICOS				
Luz	mes	1	17	17
Agua	mes	1	10	10
TOTAL (B)				364.60

Fuente: Propio de los autores (2011)

Total costo variable del diluyente leche descremada (B)	364.60
Total costos fijos de laboratorio (A)	60.00
Costo total en ocho dosis de semen.	510.15
Costo por cada una de las dosis.	53.08

Fuente: Propio de los autores (2011)

4.4.3. Costos por dosis de semen canino producida con el empleo del diluyente

TRIS

Cuadro N° 34: Costos por dosis de semen canino producida con el empleo del diluyente TRIS

Detalle	Unidad	Cantidad	Valor Unidad	Valor Total
1. DILUYENTE				
Tris	lb	1	3.15	3.15
Acido cítrico	lb	1	2.50	2.50
Fructosa	lb	1	4.00	4.00
Estreptomicina	frasco	1	3.25	3.25
Bencilpenicilina	frasco	1	3.80	3.80
Huevos	unidades	8	0.15	1.20
2. MATERIAL DE LABORATORIO				
Eosina	frasco	1	5,00	5,00
Nigrosina	frasco	1	45,00	45,00
Vaso de precipitación	unidades	1	6,00	6,00
Pipeta	unidades	1	7.80	7.80
Placas porta y cubre	unidades	50	0.08	4.00
3. MANO DE OBRA TÉCNICOS				
Mano de obra	unidades	1	260,00	260
4. SERVICIOS BÁSICOS				
Luz	mes	1	17	17
Agua	mes	1	10	10
TOTAL (B)				372.7

Fuente: Propio de los autores (2011).

Total costo variable del diluyente leche descremada (B)	372.70
Total costos fijos de laboratorio (A)	60.00
Costo total en ocho dosis de semen.	432.70
Costo por cada una de las dosis.	54.07

Fuente: Propio de los autores(2011)

**4.4.4. Costos por dosis de semen canino producida con el empleo del diluyente
leche Dog Semen Diluent**

Cuadro N° 35: Costos por dosis de semen canino producida con el empleo del
diluyente Dog Semen Diluent

Detalle	Unidad	Cantidad	Valor Unidad	Valor Total
1. DILUYENTE				
Dog Semen Diluent	dosis	3	6.15	36.90
2. MATERIAL DE LABORATORIO				
Eosina	frasco	1	5,00	5,00
Nigrosina	frasco	1	45,00	45,00
Vaso de precipitación	unidades	1	6,00	6,00
Pipeta	unidades	1	7.80	7.80
Placas porta y cubre	unidades	50	0.08	4,00
3. MANO DE OBRA TÉCNICOS				
Mano de obra	unidades	1	260,00	260
4. SERVICIOS BÁSICOS				
Luz	mes	1	17	17
Agua	mes	1	10	10
TOTAL (B)				394.3

Fuente: Propio de los autores (2011)

Total costo variable del diluyente leche descremada (B)	394.3
Total costos fijos de laboratorio (A)	60.00
Costo total en ocho dosis de semen.	453.30
Costo por cada una de las dosis.	56.78

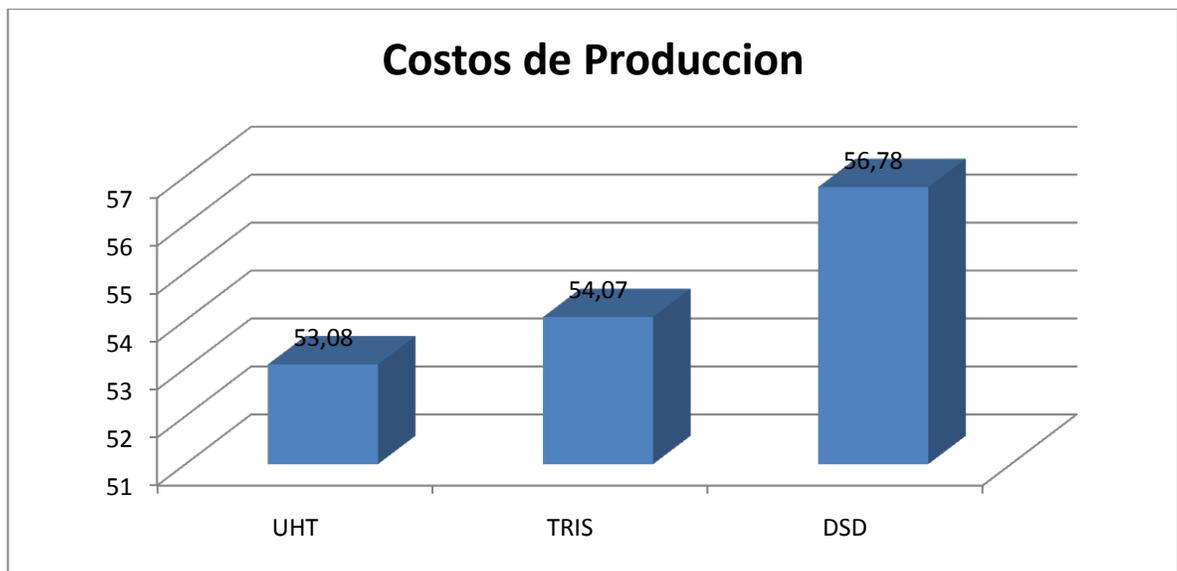
Fuente: Propio de los autores (2011)

Cuadro N° 36: Relación de costos de los diluyentes.

	UHT	TRIS	DSD
Costos Variables	364.60	372.70	394.30
Costos Fijos	60.00	60.00	60.00
Costo total	510.15	432.70	453.30
Costo por dosis	53.08	54.07	56.78

Fuente: Propio de los autores 2011

Grafico N° 11: Costos de producción de cada una de las dosis de semen.



Fuente: Propio de los autores (2011)

Sumando los costos fijos de los equipos de laboratorio más los costos variables y dividiendo para el total de dosis producidas por cada uno de los diluyentes (8 dosis) se obtuvo el valor de cada una de las dosis.

El valor de una dosis de semen canino diluido en leche UHT es de \$ 53.08 USD./dosis, mientras que cada una de las dosis de semen canino producida con el empleo del diluyente TRIS es levemente más cara su valor es de \$ 54.07 USD./dosis y al producir una dosis de semen canino con el diluyente comercial DSD el valor es de \$ 56.78 USD./ dosis.

Tras haber obtenido el análisis de costos se pudo concluir que los valores son similares y las variaciones son mínimas, mas en el análisis de costo-beneficio, el de primera elección será el Dog Semen Diluent, en tanto que el que le sigue en utilidad será el diluyente con leche descremada UHT.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Luego de haber realizado el estudio cuya finalidad fue la evaluación de tres diluyentes de semen canino; leche descremada UHT, Tris (hidroximetil)aminometano + ácido cítrico y el diluyente comercial Dog semen Diluent. Se puede concluir:

5.1 Conclusiones

- El empleo de la Leche descremada UHT, como diluyente de semen canino, es óptima hasta las 24 horas debido a que la Vitalidad disminuye en las 24 horas post-dilución mientras que a las 32 horas post-dilución ya no es viable; la utilización del Tris (hidroximetil)aminometano + ácido cítrico, como diluyente, es óptima hasta las 16 horas debido a que la Vitalidad se ve a la baja en las 24 horas post-dilución y ya no es viable; la utilización del diluyente comercial Dog Semn Diluent (Canine Pro), es óptimo hasta las 48 horas debido a que la Vitalidad desciende en las 56 horas post-dilución.
- Las muestras de diluyentes seminales que se sometieron a congelación no fueron viables para posteriores inseminaciones.
- El costo de la producción de una dosis de semen para inseminación artificial con el empleo de Leche descremada UHT es de \$53.08, de Tris

(hidroximetil)aminometano + ácido cítrico es de \$54.07, para el Dog Semen Diluent (Canine Pro) es de \$56.78.

- En relación con el costo beneficio; del empleo de los 3 diluyentes el más efectivo fue el diluyente comercial Dog Semen Diluent (Canine Pro) (\$56, 48 USD) por el tiempo de uso y la estabilidad de los parámetros (pH, motilidad, mortalidad, vitalidad) para calificar a las muestras como óptimas, seguido de la leche descremada UHT (\$ 53.08 USD) por presentar más tiempo de uso.

5.2 Recomendaciones

- Debido a la relación costo-beneficio se recomienda el uso del diluyente comercial Dog Semen Diluent (Canine Pro), por no representar una elevación sustancial del costo y por mantener parámetros óptimos para la utilización de la muestra.
- Si se dificulta la adquisición del diluyente la opción más acertada es el uso de la leche descremada UHT, por costo y factibilidad de uso hasta las 32 horas post dilución.
- Se recomienda no usar los diluyentes para la congelación puesto que ninguno se ajustó a los parámetros óptimos para su uso.

VI. RESUMEN Y SUMMARY.

5.1 Resumen.

La presente investigación se realizó en la Parroquia de la Magdalena del cantón Quito, en la Clínica Veterinaria “Los Andes”. El objetivo principal fue evaluar la leche descremada UHT y el Tris frente al diluyente comercial Dog Semen Diluent como diluyentes, su viabilidad en inseminaciones y establecer el diluyente que ofrece mejores resultados en la conservación del semen, por lo tanto mayores índices reproductivos. Se usó 8 muestras de semen canino sin diluir de un macho reproductor de raza American Pitbull Terrier de cinco años. Las muestras del semen canino fueron sometidas a un análisis macro y microscópico con el propósito de establecer la calidad de la muestra previa a su dilución, al evaluar los tres diluyentes al término de las 72 horas el diluyente Dog semen Diluent, mantuvo el pH neutro, una viabilidad de 92.01%, una motilidad espermática de 82.95% y mortalidad espermática de 8.13%, mientras el diluyente Leche descremada UHT no elevó la viabilidad espermática y se ubicó en 80.44% de células viables; una motilidad espermática de 75.68% y mortalidad espermática de 20.28% el diluyente Tris tampoco elevó la viabilidad espermática se ubicó 73.01% de células viables; una motilidad espermática de 76.98% y mortalidad espermática de 26.61 %. Debido a la relación costo-beneficio se recomienda el uso del diluyente comercial Dog Semen Diluent (Canine Pro), por no representar una elevación sustancial del costo y por mantener parámetros óptimos para la utilización de la muestra.

5.2 Summary.

The current investigation was done in Magdalena at the Clinic Veterinary “Los Andes”. The principal goal or target was to evaluate the milk UHT and Tris against to Dog Semen Diluent as the dilute and its viability in insemination and establish which dilute offer the best results with the semen’s conservation. Was used 8 samples of canine’s semen without dilute from a reproductive male of breed American Pitbull Terrier with five years. The sperm canine samples was subjected to analysis macro and microscopic with the purpose to establish the sample quality. Evaluating the dilutes ending 72 hours the dilute Dog Semen Diluent preserved neutral pH, a viable of 92.01%; sperm motility of 82.95% and sperm mortality of 8.13% while the Milk descream UHT dilute doesn’t lift sperm viable and it’s place in 80.44% of viable cells; an sperm motility of 75.68% and sperm mortality of 20.28%. the Tris (hidroximetil)aminometano + acido cítrico dilute neither lift sperm viable and it’s place 73.01% of viable cells; an sperm motility of 76.98% and sperm mortality of 26.61%. Because the cost-benefit is recommended to use the commercial diluent Dog Semen Diluent (Canine Pro), not to represent a substantial cost increase and maintain optimal parameters for the use of the sample.

VI.-BIBLIOGRAFÍA

- 1.- AGROBIT. 2010. Composición de la leche y Valor Nutritivo.
http://www.agrobit.com/Info_tecnica/Ganaderia/prod_lechera/pr.htm
- 2.- BAQUERO, JR, *et al* 2004. Evaluación de dos diluyentes para la conservación de semen canino bajo condiciones de refrigeración: efecto del tiempo de refrigeración, grado de dilución y de la concentración de fructosa. Universidad de lo Llanos. Villavicencio Colombia.
- 3.- CALDERÓN ANGELA. 2007, Reproducción e Inseminación Animal, Cátedra de Reproducción animal e Inseminación Animal. Universidad Estatal de Bolívar. Guaranda Ecuador (Copiladora).
- 4.- CAMACHO, D. 2000. Valoración de calidad de semen porcino. Tesis de doctor en medicina veterinaria, Universidad Central del Ecuador. Quito Ecuador
- 5.- CASTRO ISIDRO *et al* 1999-2002. Reproducción. Diplomado en Medicina, Cirugía y Zootecnia en perros y Gatos. Universidad Autónoma de México.

6.- CRYOCEL, 2010 Banco de Semen Canino

Semen Congelado.

<http://www.cryocel.com/cryocelesp/semencongelado/index.html>

Semen Refrigerado.

<http://www.cryocel.com/cryocelesp/semenrefrigerado/index.html>

7.- CUNNINGHAM, J.G. 2001. Fisiología veterinaria. 2^{da} Edición Nueva editorial Interamericana MacGraw- Hill. Interamericana Philadelphia USA.

8.- ESQUIVEL CARLOS, 2010. Avances en el uso de la Biotecnología en la reproducción Canina. Hospital Veterinario UNAM.

9.- ESQUIVEL CARLOS, et al 2010. Inseminación Artificial con semen fresco en la Perra. Universidad Autónoma de México

10.- FELDMAN *et al* 2001. Manual de reproducción animal.

11.- FRANDSON, R. SPURGEON T. 2001. Anatomía y Fisiología de los Animales Domésticos. 5^{ta} Edición Editorial Interamericana MacGraw- Hill México D.F.

- 12.- GARCIA AUVRIGNY. 2010 Federación Canófila Mexicana.
<http://www.fcm.org.mx/invest/inseminacion.shtml>
- 13.- HAFEZ, 2002. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 7^{ma} edición. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana. México-México.
- 14.- HILL *et al.* 2006. Fisiología Animal. 1^o edición. Editorial Panamericana. Madrid- España.
- 15.- INTERVET. 2006 Compendio de reproducción animal. Editor Laboratorios Intervet S.A. Segunda edición. Quifatex S.A. España
- 16.- KUBUS, S.A. 2000 Manual de inseminación Artificial Porcina. Madrid, Marcar S.A.
- 17.- MANEJO DE PROCREACION DE LA PERRA. 2010.
<http://www.tc.umn.edu/~rootk001/2manejo.htm>
- 18.- MARTINEZ PEDRO. 2010 La leche y sus derivados
<http://www.pmmministries.com/ministeriosalud/Leche/introduccion.htm>
- 19.- MELLISO EDWIN. 2007. Anatomía de los Órganos Genitales del Macho. Universidad Nacional Agraria La Molina.

- 20.- MINITUBE. 2010. Abfull und Labortechnik GmbH & Co.KG. Mode d'emploi
– Canine-Pro. www.minitube.de
21. - MERCK SHARP AND DOWN 2002 Manual Merck de Medicina Veterinaria.
Sexta Edición. Editorial Centrum Merial. Madrid España
- 22.- PARAMO ROSA *et al.* 2005, Manual de prácticas de manejo reproductivo en
caninos. Reproducción. Diplomado en Medicina, Cirugía y Zootecnia en
perros y Gatos. Universidad Autónoma de México.
- 23.- PAZOS JOSE. 2010 Tipos de inseminación Artificial <http://sanbernardos.es/tiposde.htm>
- 24.- RILLO, MARTIN S. *Et al.* 2001 Porcino Ibérico. Bases de la reproducción e
inseminación del porcino Editorial Mundi-Prensa Madrid-España.
- 25.- ROLF E. *et al.*, 2007. 39th Annual Research Symposium and Annual Meeting:
Brededing soundness and handling in the stud dog. Proceedings of the
annual meeing. Denver Colorado.
- 26.- ROOT MARGARETH. 2005. Manual de Reproducción del perro y el gato. 1º
edición. Editorial Multimédica Ediciones Veterinarias. Barcelona España.
- 27.- STORNELLI MARIA ALEJANDRA. *et al.*, 2010. Inseminación Artificial con
semen fresco, refrigerado y congelado. Aplicación y desarrollo en
caninos. La Plata, Argentina.

- 28.- SCRIB. 2010. Definición y estructura del espermatozoide.
<http://www.scribd.com/doc/8481761/Definicion-y-Estructura-Del-Espermatozoide>.
- 29.- SANCHEZ *et al.* 2006. Obtención de cachorros mediante inseminación artificial con semen canino refrigerado. Primera descripción en Chile.. Valdivia Chile.
- 30.- SORENSEN, A. 2002 Reproducción animal principios y prácticas. Traducido del ingles por Ramón Elizoldo Mata. 3^{ra} edición. Mexico, Editorial Mc Graw Hill.
- 31.- WANKE MARIA, *et al.* 2006. Reproducción en caninos y felinos domésticos. 1^o edición. Editorial InterMedica. Buenos Aires Argentina.
- 32.-Wikipedia. 2010. Enciclopedia de Contenido Libre.
<http://es.wikipedia.org/wiki/Wikipedia:Portada>,
http://es.wikipedia.org/wiki/%C3%81cido_c%C3%ADtrico
<http://es.wikipedia.org/wiki/Fructosa>
[http://es.wikipedia.org/wiki/La_Magdalena_\(parroquia\)](http://es.wikipedia.org/wiki/La_Magdalena_(parroquia))
<http://es.wikipedia.org/wiki/Tris>
<http://es.wikipedia.org/wiki/Ultrapasteurizaci%C3%B3n>

ANEXOS

4. Registro de Laboratorio Control de Diluyentes

Muestra		Fecha	Hora	pH			Motilidad esperm.				Espermatozoides muertos	Espermatozoides anormales	Vitalidad espermatica
				Ac	Ne	Bs	75 - 100 %	50 - 75 %	25 - 50 %	0 - 25 %			
1		/ / 2011	8										
2		/ / 2011	16										
3		/ / 2011	24										
4		/ / 2011	32										
5		/ / 2011	40										
6		/ / 2011	48										
7		/ / 2011	56										
8		/ / 2011	64										
9		/ / 2011	72										
10		/ / 2011	72										
PROMEDIO													

Codigo: T1UHT

Fecha de Dilucion 2011/ / Hora de Dilucion: :

Observaciones:

Fuente: Propio de los Autores (2011)

Muestra		Fecha	Hora	pH			Motilidad esperm.				Espermatozoides muertos	Espermatozoides anormales	Vitalidad espermatica
				Ac	Ne	Bs	75 - 100 %	50 - 75 %	25 - 50 %	0 - 25 %			
1		/ / 2011	8										
2		/ / 2011	16										
3		/ / 2011	24										
4		/ / 2011	32										
5		/ / 2011	40										
6		/ / 2011	48										
7		/ / 2011	56										
8		/ / 2011	64										
9		/ / 2011	72										
10		/ / 2011	72										
PROMEDIO													

Codigo: T2TRIS

Fecha de Dilucion 2011/ / Hora de Dilucion: :

Observaciones:

Fuente: Propio de los Autores (2011)



DILUYENTE DogSemenDiluent



Codigo: **T0DSD**

Fecha de Dilucion 2011/ /

Hora de Dilucion: :

Muestra	Fecha	Hora	pH			Motilidad esperm.				Espermatozoides muertos	Espermatozoides anormales	Vitalidad espermatica
			Ac	Ne	Bs	75 - 100 %	50 - 75 %	25 - 50 %	0 - 25 %			
1	/ / 2011	8										
2	/ / 2011	16										
3	/ / 2011	24										
4	/ / 2011	32										
5	/ / 2011	40										
6	/ / 2011	48										
7	/ / 2011	56										
8	/ / 2011	64										
9	/ / 2011	72										
10	/ / 2011	72										
PROMEDIO												
Observaciones:												

Fuente: Propio de los Autores (2011)

6. Registro de Laboratorio Control de Diluyentes

Muestra		Fecha	Hora	pH			Motilidad esperm.				Espermatozoides muertos	Espermatozoides anormales	Vitalidad espermatica
				Ac	Ne	Bs	75 - 100 %	50 - 75 %	25 - 50 %	0 - 25 %			
1		9 / 05 2011	8		7,1		85				5	1	95
2		10 / 05 2011	16		7		85				8	1	92
3		10 / 05 2011	24		7		80				10	1	90
4		10 / 05 2011	32		7		80				15	1	85
5		11 / 05 2011	40		7		75				18	1	82
6		11 / 05 2011	48		7		70				28	1	72
7		11 / 05 2011	56		7		70				20	1	80
8		12 / 05 2011	64		6,8		70				25	1	75
9		12 / 05 2011	72		6,5		70				30	1	70
10		12 / 05 2011	72		6,8		60				45	1	55
PROMEDIO													
Observaciones:													

Fuente: Propio de los Autores (2011)

Muestra		Fecha	Hora	pH			Motilidad esperm.				Espermatozoides muertos	Espermatozoides anormales	Vitalidad espermatica
				Ac	Ne	Bs	75 - 100 %	50 - 75 %	25 - 50 %	0 - 25 %			
1		9 / 05 2011	8		7		85				5	1	95
2		10 / 05 2011	16		7		85				10	1	90
3		10 / 05 2011	24		6,5		85				25	1	75
4		10 / 05 2011	32		6,5		80				30	1	70
5		11 / 05 2011	40		6,5		80				25	1	75
6		11 / 05 2011	48		6		80				30	1	70
7		11 / 05 2011	56		6		70				30	1	70
8		12 / 05 2011	64		6,5		75				35	1	65
9		12 / 05 2011	72		6,5		75				35	1	65
10		12 / 05 2011	72		6		70				32	1	68
PROMEDIO												1	
Observaciones:													

Fuente: Propio de los Autores (2011)



DILUYENTE DogSemenDiluent



Codigo: **T0DSD**

Fecha de Dilucion **2011/May/09**

Hora de Dilucion: **9:30**

Muestra	Fecha	Hora	pH			Motilidad esperm.				Espermatozoides muertos	Espermatozoides anormales	Vitalidad espermatica
			Ac	Ne	Bs	75 - 100 %	50 - 75 %	25 - 50 %	0 - 25 %			
1	9 / 05 2011	8		7			85			5	1	95
2	10 / 05 2011	16		7,1			85			5	1	95
3	10 / 05 2011	24		7,1			85			6	1	94
4	10 / 05 2011	32		7			85			8	1	92
5	11 / 05 2011	40		7,1			80			7	1	93
6	11 / 05 2011	48		7,2			80			9	1	91
7	11 / 05 2011	56		7,2			85			10	1	90
8	12 / 05 2011	64		7			80			10	1	90
9	12 / 05 2011	72		7			85			10	1	90
10	12 / 05 2011	72		7			80			32	1	68
PROMEDIO												

Observaciones:

Fuente: Propio de los Autores (2011)

7.- FOTOGRAFIAS DEL TRABAJO DE CAMPO

Extracción del semen Canino



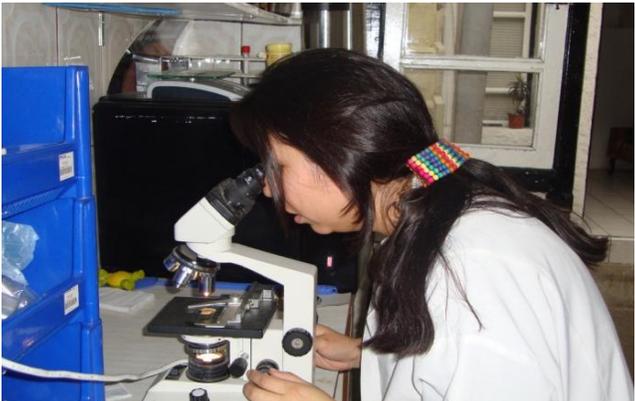
Evaluación de diluyentes



Preparación de Diluyentes



Evaluación de diluyentes



Visita de Campo al Lugar de investigación



8.- GLOSARIO

Anaerobio.- Dicho de un organismo: Que puede vivir sin oxígeno. Microorganismo que crece y que vive en ausencia completa o casi completa de oxígeno.

Anastomosis: Unión de unos elementos anatómicos con otros de la misma planta o del mismo animal.

Diluyentes.- Sustancia, en general un líquido, que hace una solución más fina, menos viscosa o más líquida.

Eosina.- Grupo de tinciones ácidas xantínicas, rojas, que normalmente se utilizan en combinación con tinciones básicas azul-púrpura como la hematoxilina, para teñir preparaciones de tejidos en el laboratorio.

Espermatozoide.- Célula germinal del macho maduro, que se desarrolla en los túbulos seminíferos de los testículos. Parecido a un renacuajo, tiene una longitud aproximada de 50 mm, y presenta una cabeza con un núcleo, un cuello y una cola que le permite la propulsión. Gameto masculino, destinado a la fecundación del óvulo.

Espermicida: Sustancia que inhibe la actividad de los espermatozoides, por lo que se usa como anticonceptivo.

Estro: Período de celo de los mamíferos.

Eritrocitos: son los elementos formes cuantitativamente más numerosos de la sangre. La hemoglobina es uno de sus principales componentes, y su objetivo es transportar el oxígeno hacia los diferentes tejidos del cuerpo.

Germidal: Presenta como una solución acuosa de color naranja que contiene gluconato de clorhexidina 1,5% p/v y cetrimida al 15% p/v

Hermético: que se cierra de modo que no permite pasar el aire ni los fluidos.

Leucocitos: son un conjunto heterogéneo de células sanguíneas que son los efectores celulares de la respuesta inmune, así intervienen en la defensa del organismo contra sustancias extrañas o agentes infecciosos (antígenos). Se originan en la médula ósea y en el tejido linfático

Motilidad.- Movimientos espontáneos, que facilitan la movilidad.

Patente: Documento en que oficialmente se le reconoce a alguien una invención y los derechos que de ella se derivan.

pH.- Abreviatura de potencial de hidrógeno, escala que representa la acidez relativa (o alcalinidad) de una solución, en la que un valor de 7,0 es neutro, por debajo de 7,0 es ácido y por encima de 7,0 es alcalino. El valor numérico del pH es igual al logaritmo negativo de la concentración de hidrogeniones expresada en moles por litro. Medida de acidez de una solución.

Semen.- Conjunto de espermatozoides y sustancias fluidas que se producen en el aparato genital masculino de los animales y de la especie humana. Secreción blanquecina y espesa de los órganos reproductores masculinos, expulsada a través de la uretra en la eyaculación. Contiene varios componentes: los espermatozoos inmersos en su plasma nutriente y las secreciones de la próstata, las vesículas seminales y otras diversas glándulas.

Suigéneris.- algo que tiene un olor característico, inconfundible.

Termorregulación: es la capacidad del cuerpo para regular su temperatura. Los animales homeotermos tienen capacidad para regular su propia temperatura

Viabilidad.- Que puede vivir. Se dice principalmente de las criaturas que, nacidas o no a tiempo, salen a luz con robustez o fuerza bastante para seguir viviendo.