



UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLÍVAR

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

POSGRADO

MAESTRÍA CIENCIA VETERINARIAS

COHORTE I

MODALIDAD DE TITULACIÓN

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Tema:

“Evaluación de tres protocolos de crioconservación de semen canino de alta genética”

AUTOR:

Alexis Iván Tamayo Cabay.

TUTOR:

Alex Arturo Villafuerte Gavilánez.

GUARANDA-ECUADOR

2024-2025

CERTIFICACIÓN DEL TUTOR

Yo, Dr. Alex Arturo Villafuerte Gavilánez en mi calidad de Tutor del Proyecto de Investigación como modalidad de titulación establecida en el Reglamento de Admisión, Matriculación, Permanencia y Graduación en Programas de Posgrado y Educación Continua de la Universidad Estatal de Bolívar, designado por el Comité Académico de Posgrado y ratificado mediante Resolución de la Comisión Académica de la Universidad, bajo juramento CERTIFICO que el señor Alexis Iván Tamayo Cabay, maestrante de la Maestría en Ciencias Veterinarias, ha cumplido íntegramente con los requerimientos del proyecto de investigación previo a la obtención del título de Magíster en Ciencias Veterinarias, cuyo tema es: “Evaluación de tres protocolos de crioconservación de semen canino de alta genética”. Durante el desarrollo del estudio he trabajado conjuntamente con el investigador, constatando que el trabajo presentado es de su exclusiva autoría. En virtud de ello, se aprueba el proyecto con la calificación de DIEZ (10/10).

Es cuanto puedo certificar en honor a la verdad, facultando al interesado a hacer uso de la presente declaración para su entrega y calificación ante el Tribunal respectivo.



Dr. Alex Arturo Villafuerte Gavilánez

TUTOR

DERECHOS DE AUTOR

Yo Alexis Iván Tamayo Cabay, portador de la Cédula de Identidad No. 0604353334 en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales

Del Trabajo de Titulación: Evaluación de tres protocolos de crioconservación de semen canino de alta genética, modalidad tesis de investigación, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN, concedo a favor de la Universidad Estatal de Bolívar, una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos. Conservo a mi favor todos los derechos de autor sobre la obra, establecidos en la normativa citada.

Así mismo, autorizo a la Universidad Estatal de Bolívar, para que realice la digitalización y publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Digital, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

El autor declara que la obra objeto de la presente autorización es original en su forma de expresión y no infringe el derecho de autor de terceros, asumiendo la responsabilidad por cualquier reclamación que pudiera presentarse por esta causa y liberando a la Universidad de toda responsabilidad.



Alexis Iván Tamayo Cabay.

DEDICATORIA

A Dios, fuente infinita de sabiduría y refugio en tiempos de incertidumbre. Gracias por ser la brújula que me guía cuando el horizonte se veía distante.

A mis padres, Alicia Cabay y Ángel Tamayo, por su infinita paciencia, por su amor incondicional y por haber creído en mí aun cuando yo mismo dudaba. Su apoyo fue la base de este logro.

Al Dr. M.V.Z. Alex Villafuerte, mi tutor y ejemplo, por sus valiosas enseñanzas y la generosidad con la que me ofreció oportunidades que no fueron pocas. Aprecio su paciencia en cada etapa de este proceso; su guía no solo fue académica sino también humana y formativa. A su esposa, María Fernanda Vásconez, por su apoyo incondicional, su amabilidad y por ser parte del ambiente que me recibió con respeto, calidez y alegría.

A mis amigos de siempre, por estar a mi lado incluso cuando estamos lejos, también a los amigos a quienes conocí durante la maestría “Equipo Blue”, compañeros en el esfuerzo y cómplices en nuestra travesía compartida de largas jornadas, aprendiendo unos de otros apoyándonos mutuamente hasta alcanzar el objetivo mutuo que nos propusimos.

Y a esa parte de mí que aprendió que no todo lo verdadero necesita ser visible, que los lazos más fuertes a veces se forjan en mundos que otros llaman ficticios. Que comprendió que mientras uno siga creyendo, el mundo que habita, aunque improbable, se vuelve real.

INDICE

DECLARACIÓN JURAMENTADA DE AUTENTICIDAD DE AUTORÍA...	I
DERECHOS DE AUTOR	II
DEDICATORIA	III
INDICE	IV
ÍNDICE DE TABLAS	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
RESUMEN	VIII
ABSTRACT.....	IX
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I.	2
1.1. Planteamiento del problema.....	2
1.2. Formulación del Problema:	3
1.3. Justificación	4
1.4.1. Objetivos Generales:	5
1.4.2. Objetivos específicos:	5
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.	6
2.1. Antecedentes investigativos:.....	6
2.2. Fundamentación teórica.....	7
2.2.1. Evaluación Seminal en caninos.....	7
2.2.2. Parámetros macroscópicos del eyaculado canino.....	8
2.2.3. Parámetros microscópicos del eyaculado canino.....	9
2.2.4. Métodos de análisis Seminal.....	12
2.3. Métodos de crioconservación del semen canino.....	14
2.4. Diluyentes	14
2.4.2. Yema de huevo como crioprotector.....	16

2.4.3. Función del glicerol como crioprotector.....	18
2.4.4. Antibióticos.....	19
2.4.5. Azúcares.....	20
2.4.6. Antioxidantes	20
2.4.7. Sistemas buffer	21
2.4.8. Métodos de preservación de semen.....	22
Hipótesis y variables	22
2.5. Hipótesis:	22
2.6. Variables	23
CAPÍTULO III. DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA	25
3.1 Tipo, nivel y método de investigación	25
3.2 Población y muestra	25
3.3 Diseño experimental.....	26
CAPÍTULO IV: RESULTADOS	43
CONCLUSIONES	55
RECOMENDACIONES.....	57
BIBLIOGRAFÍA	59
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Operacionalización de la variable independiente y dependiente	23
Tabla 2	Materiales, reactivos y equipos empleados en el protocolo experimental	25
Tabla 3	Fases de evaluación seminal y variables analizadas	26
Tabla 4	Composición cualitativa y cuantitativa de los diluyentes evaluados	26
Tabla 5	Escala de puntuación de motilidad masal del semen canino	40
Tabla 6	Parámetros macroscópicos del eyaculado canino fresco.	43
Tabla 7	Características microscópicas del semen canino post dilución con el diluyente uno	44
Tabla 8	Características microscópicas del semen canino post dilución con el diluyente dos	45
Tabla 9	Características microscópicas del semen canino post dilución con el diluyente tres	45
Tabla 10	Características microscópicas del semen canino post descongelamiento con el diluyente uno	46
Tabla 11	Características microscópicas del semen canino post descongelamiento con el diluyente dos	47
Tabla 12	Características microscópicas del semen canino post descongelamiento con el diluyente tres	47
Tabla 13	Análisis de Varianza ADEVA para la variable motilidad masal	48
Tabla 14	Prueba de Tukey al 5% aplicada a los tres diluyentes	49
Tabla 15	Análisis de varianza ADEVA para la variable morfología	50
Tabla 16	Prueba de Tukey al 5% de la variable morfología	51
Tabla 17	Análisis de varianza ADEVA para la variable viabilidad	52
Tabla 18	Prueba de Tukey al 5% de la variable viabilidad	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Ejemplar canino “Odín” durante la fase de estimulación previa a la recolección seminal.....	28
Figura 2 Ejemplar canino "Jasper" durante la fase de estimulación previa a la recolección seminal	28
Figura 3 Extracción mediante técnica manual en canino “Max”.....	29
Figura 4 Extracción mediante técnica manual en canino “Jasper”	29
Figura 5 Paso de semen fresco con micropipeta a tubo	30
Figura 6 Paso de semen fresco con jeringa de 1 ml a tubo	30
Figura 7 Registro de características macroscópicas y volumétricas	31
Figura 8 Recuento con cámara de Neubauer para medir concentración.....	32
Figura 9 Placa calefactora con portaobjetos con la muestra seminal.	32
Figura 10 Análisis seminal (400x).....	33
Figura 11 Análisis seminal con eosina–nigrosina.....	34
Figura 12 Análisis seminal de morfología.....	35
Figura 13 Pajuelas de almacenamiento etiquetadas.....	36
Figura 14 Llenado de pajuelas con el semen diluido.....	36
Figura 15 Sellado de las pajuelas.....	37
Figura 16 Pajuelas antes de meter a refrigeración	37
Figura 17 Pajuelas expuestas a vapores de nitrógeno	38
Figura 18 Pajuelas lanzadas al contenedor con nitrógeno líquido.....	38
Figura 19 Pajuelas en el termo de nitrógeno líquido ya almacenadas	39
Figura 20 Motilidad masal de los tres diluyentes.....	50
Figura 21 Variable Morfología	52

RESUMEN

Este estudio se centró en evaluar tres protocolos de crioconservación para semen canino de alta calidad genética, con el objetivo de determinar cuál es el diluyente más efectivo en preservar los parámetros espermáticos después del proceso de congelación y descongelación. Se obtuvieron muestras seminales de seis perros clínicamente sanos, provenientes de razas y tamaños diversos; estas fueron procesadas empleando tres diluyentes experimentales diferentes.

Se estudiaron las características microscópicas del semen tras la dilución y congelación, centrándose en la motilidad masiva, morfología espermática normal y viabilidad celular. Los resultados mostraron que el tercer diluyente (D3), compuesto por Tris, yema de huevo y antibióticos, alcanzó valores significativamente más altos ($p < 0.05$). En promedio obtuvo un 70.83% en motilidad, un 75.83% en morfología normal y un 69.5% en viabilidad espermática.

Estos descubrimientos apoyan la creación de un protocolo práctico y efectivo para la crioconservación del semen canino, adaptado a las condiciones y recursos disponibles en Ecuador. Su aplicación permitirá establecer bancos regionales de germoplasma, fomentando así la conservación de la diversidad genética en perros y reforzando los programas nacionales de reproducción asistida.

Palabras clave: *Crioconservación; Motilidad; Viabilidad; Germoplasma; tris.*

ABSTRACT

This study evaluated three cryopreservation protocols for high-genetic-merit canine semen to identify the extender that best preserves sperm quality after freeze–thawing. Semen samples were collected from six clinically healthy dogs of various breeds and sizes and processed with three experimental extenders.

Microscopic assessments performed after dilution and cryopreservation focused on total motility, normal sperm morphology, and cell viability. The third extender (D3)—a Tris-based formula supplemented with egg yolk and antibiotics—produced significantly higher values ($p < 0.05$), averaging 70.83 % motility, 75.83 % normal morphology, and 69.5 % viability.

These findings support the development of a practical, effective canine semen cryopreservation protocol adapted to Ecuadorian conditions and resources. Its implementation will facilitate the creation of regional germplasm banks, promote genetic diversity conservation in dogs, and strengthen national assisted-reproduction programs.

Keywords: *Cryopreservation; Motility; Viability; Germplasm; Tris.*

INTRODUCCIÓN

La crioconservación de semen, junto con la inseminación artificial, es una estrategia clave en medicina veterinaria para difundir germoplasma de alto valor genético y acelerar programas de mejoramiento. Aunque los protocolos modernos aún presentan una pérdida del 40-50 % de la población espermática tras la descongelación, su uso en bovinos, porcinos y pequeños rumiantes ha cambiado el comercio internacional de recursos reproductivos. En caninos, la aceptación crece rápidamente, con un aumento anual del 42% en el uso de semen canino congelado en Europa, aunque aún no es un procedimiento estándar y muchos lotes no se utilizan. (Sharafi et al., 2022)

La mejora continua de los protocolos caninos ha elevado las tasas de recuperación post-descongelación a rangos del 50-75 %, e incluso superiores cuando se optimizan factores como la concentración de glicerol y la velocidad de enfriamiento. Ensayos recientes demuestran que ajustar los elementos del diluyente y emplear velocidades de congelación controladas incrementa significativamente la motilidad progresiva y la integridad acrosomal. (Sharafi et al., 2022)

Este método en los últimos años ha tenido gran relevancia ayudando a mantener las funciones de los espermatozoides tratando de no afectar su viabilidad. Un manejo adecuado del semen, junto con el uso del diluyente apropiado para evitar la mortalidad de los espermatozoides, el método de conservación debe ser el adecuado para lograr disminuir la pérdida de la fertilidad del producto. Por lo que mejorar la calidad del semen se utilizan diluyentes que ayudan y aportan energía, protección a los cambios de temperatura, nutrición, incremento de la motilidad espermática, evitando así el estrés oxidativo. (Partyka et al., 2024)

En América Latina se han logrado avances: en Brasil, semen de perros con hiperplasia prostática benigna se mantuvo parámetros funcionales tras la criopreservación; en Ecuador, el uso de L-carnitina mejoró motilidad y fertilidad in vitro, en Ecuador existen pocos estudios sobre criopreservación canina, por lo que es necesario investigar técnicas y protocolos para conservar semen de alta genética y preservar la biodiversidad del país. (Ramón López et al., 2024; Flores et al., 2022)

CAPÍTULO I.

1.1. Planteamiento del problema

En el ámbito global, las técnicas de reproducción asistida en perros son fundamentales para la conservación y mejora genética de las razas. Estas prácticas ayudan a mantener la diversidad genética y promover características deseadas. No obstante, pese a los avances logrados en inseminación artificial, todavía existen desafíos importantes en este ámbito. Entre estos se encuentran una disponibilidad limitada de material genético de alta calidad, la falta de protocolos eficaces estandarizados para congelar semen y dudas sobre su viabilidad después del proceso frío-congelamiento-descongelación. Estos obstáculos no solo dificultan el desarrollo eficaz programas especializados; sino también ponen peligro diverso poblacional especialmente aquellas razas escasas o con número reducido ejemplares vivos disponibles dentro comunidades, estas faltas no solo obstaculizan la implementación de programas efectivos de reproducción asistida, sino que también ponen en riesgo la diversidad genética, particularmente en razas raras o con poblaciones reducidas.

En Ecuador, estos desafíos son aún más pronunciados debido a la falta de infraestructura adecuada, recursos limitados y escaso conocimiento técnico disponible. La carencia de protocolos adaptados a las condiciones locales complica la implementación de estas técnicas, creando obstáculos para los criadores caninos y veterinarios. Además, factores como el clima y las distancias geográficas perjudican la calidad del semen durante su transporte, afectando tanto su viabilidad como movilidad espermática y reduciendo así el éxito de la inseminación artificial.

A nivel local, establecer un banco de semen canino que asegure el acceso a material genético de calidad y mejore los tiempos de congelación se presenta como una solución urgente. Esta propuesta no solo favorecería a criadores y veterinarios, sino que también ayudaría en la preservación y diversificación genética de las razas caninas en la región, abordando una necesidad crítica reconocida en el campo de la reproducción asistida. (Ramón López et al., 2024)

1.2. Formulación del Problema:

¿Qué tipo de diluyente resulta más efectivo para preservar el esperma canino y desarrollar un protocolo estandarizado para la implementación de un banco de germoplasma de alta calidad genética en la clínica veterinaria “Animal Planet”, ubicada en la provincia de Chimborazo, ¿cantón Riobamba durante el año 2024?

1.3. Justificación

La creación de un banco de germoplasma de alta genética con la implementación de un protocolo de crioconservación de semen canino es esencial para preservar y mejorar la diversidad genética en el ámbito reproductivo de los canino y permitirá disminuir los riesgos asociados a enfermedades o problemas reproductivos de los machos conservando su alta calidad genética además de su uso aplicado como herramienta clínica en hembras con problemas con vagina estrecha, hembras con problemas conductuales, machos con diferencias de estatura con respecto a la hembra o debilidad a la hora de la monta. (Arango Múnera et al., 2020).

La falta de acceso a semen de calidad, infraestructura, equipos y recursos así también como la ausencia de información precisa son obstáculos que afectan la eficacia de los programas de reproducción asistida, es por esta razón que esta investigación nos ayudará a determinar cómo afecta la adición de 3 dilutores en el semen canino pre congelación y post congelación. (Banchi et al., 2023). Esto contribuirá a llenar un vacío crucial en el conocimiento científico en el campo de la reproducción asistida en caninos, además, su valor reside en su capacidad para crear herramientas científicas y prácticas que ayuden a superar los obstáculos actuales, como la carencia de infraestructura y el déficit de conocimientos técnicos especializados. Asimismo, aportará al desarrollo de estrategias sostenibles destinadas a asegurar la conservación genética y el bienestar animal. (Ogata et al., 2025)

Los favorecidos directos incluirán a criadores, propietarios de mascotas, médicos veterinarios y asociaciones relacionadas con la crianza canina, con la capacidad de influir en las prácticas de reproducción asistida en múltiples regiones. El impacto de la investigación radicó en que pondrá a disposición semen de alta aptitud que puede abarcar gran parte de la zona central del país, además, del establecimiento de un protocolo de crioconservación ideal y eficiente para semen canino, la combinación de estos dos aspectos proporcionará un enfoque único y completo que promete resultados innovadores y aplicables en el campo de la medicina veterinaria.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivos Generales:

“Evaluar 3 protocolos de crioconservación de semen canino de alta genética”

1.4.2. Objetivos específicos:

- Recolectar y procesar el semen canino utilizando 3 diferentes medios de crioconservación.
- Evaluar las características macroscópicas y microscópicas del semen crio- conservado post dilución y post descongelamiento.
- Elaborar un protocolo de crioconservación de semen canino para el establecimiento de un banco de germoplasma con los resultados obtenidos.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.

2.1. Antecedentes investigativos:

La criopreservación de semen en perros es una técnica ampliamente reconocida en el ámbito de la reproducción asistida, ya que permite conservar material genético valioso y facilita programas de mejora genética y ayuda a la preservación de razas caninas. En las últimas décadas, diversas investigaciones han investigado a fondo los factores que afectan la calidad del espermatozoides durante los procesos de congelamiento y descongelamiento, recalcando el papel crucial que juegan los diluyentes y crioprotectores para asegurar la viabilidad del espermatozoides canino.

Montoya-Páez et al. (2020) investigaron el uso de tres concentraciones diferentes de yema de huevo centrifugada como principal componente en diluyentes para la criopreservación del semen bovino. El estudio demostró que una concentración al 10% mejoró significativamente tanto la motilidad progresiva como la integridad de las membranas espermáticas. Aunque esta investigación se enfocó en bovinos, sus resultados son relevantes para procesos de criopreservación en caninos, destacando especialmente la importancia que tienen los componentes lipídicos para asegurar las membranas celulares espermáticas durante variaciones térmicas.

Herrera Pullas (2021) llevó a cabo un estudio sobre la eficacia del diluyente comercial de uso canino en la criopreservación de semen canino. Los hallazgos indicaron una motilidad espermática post-descongelación del 70.92%. Los resultados sitúan al diluyente 2 como una de las opciones más efectivas disponibles en el mercado, destacándose por su habilidad para proteger la estructura celular y minimizar los daños durante los procesos de congelación y descongelación del semen canino.

Arango Múnera et al. (2020) evaluaron el desempeño del diluyente 3 de uso general bovino en semen canino almacenado en pajillas francesas. A pesar de que los resultados mostraron una motilidad individual postcongelación del 51%, el estudio recalcó la necesidad de ajustar el protocolo para mejorar los resultados. Su trabajo sugiere que el diluyente 3 podría ser una opción viable para la criopreservación en

perros, especialmente cuando se tienen en cuenta aplicaciones específicas y condiciones controladas.

Nazeri et al. (2022) evaluaron en su estudio distintos tipos de concentraciones de plasma de yema de huevo (0%, 20%, 40%) a las cuales combinaron con glicerol (1,5% y 5%) en un diluyente de base tris para semen canino, en los resultados que obtuvieron encontraron que luego de 72 horas de la refrigeración y la descongelación los diluyentes con 20% o 40% de plasma de yema de huevo tuvieron parámetros superiores en lo que se refiere a los de motilidad total y progresiva, viabilidad e integridad del acrosoma en contraste con el que no tenía plasma de yema de huevo, su estudio sugiere que una concentración adecuada de yema de huevo mejora la crio protección del semen canino.

2.2.Fundamentación teórica

2.2.1. Evaluación Seminal en caninos.

Es importante subrayar que la evaluación de calidad del semen canino y su capacidad fecundante para IA en hembras se basa en una amplia gama de pruebas de laboratorio para evaluar la calidad del semen. Estas pruebas han sido desarrolladas con el propósito específico de predecir la función espermática. El empleo conjunto de estas pruebas puede mejorar considerablemente la precisión a la hora estimar dicha funcionalidad reproductiva (Herrera Pullas, 2021).

En este contexto, es importante decir que el análisis del semen canino ese pone como una herramienta al momento de diagnosticar el potencial reproductivo de los caninos, ya que nos permite evaluar condiciones de infertilidad o poca fertilidad en ellos, esto es útil al momento de dirigir el manejo re la reproducción ya sea para una inseminación artificial o la criopreservación del semen, así mismo, tener valores de referencia que cumplan con estándares mínimos permite a médicos veterinarios interpretar resultados con mayor precisión y tomar decisiones correctas durante la selección de machos reproductores y en la evaluación del semen crio preservado (Crepaldi et al., 2024).

Es así que, previo a la aplicación de cualquier método de reproducción asistida, resulta necesario el realizar un análisis del semen que permita confirmar la calidad del eyaculado. Este diagnóstico previo es relevante tanto en montas naturales como en programas de inseminación artificial, ya que, en caso de identificarse una calidad deficiente, se pueden establecer estrategias de mejora o descartar temporalmente o definitivamente al macho canino. Asimismo, cuando se planifica la conservación del semen mediante refrigeración o criopreservación, la evaluación inicial permite anticipar el grado de deterioro espermático esperado. De hecho, se ha reportado que los procesos de congelación y descongelación pueden ocasionar una pérdida de hasta el 50 % en la calidad seminal, afectando parámetros como la motilidad, viabilidad y morfología (Puerto Belta, 2021).

2.2.2. Parámetros macroscópicos del eyaculado canino.

En lo que se refiere a la evaluación macroscópica es un factor que constituye la primera aproximación a la evaluación general del semen canino además que es fundamental para una apreciación inicial del estado del eyaculado, los parámetros a evaluar en este estado son principalmente el volumen, el color, el aspecto físico y el pH, los cuales pueden verse alterados por problemas con la recolección, salud del animal o enfermedades urogenitales del macho, aunque estos parámetros pueden no mostrar de por sí la fertilidad del macho nos ofrecen información que es valiosa al momento de calificar la eyaculación así como la calidad de la muestra seminal (Crepaldi et al., 2024).

El volumen del semen canino luego del retiro de la fracción pre-espermática va a variar con respecto a varios factores como la raza, la edad y el estado fisiológico del canino, se ha reportado que en razas medianas se ha reportado un volumen de eyaculado promedio de 2.17 ± 0.16 ml, lo cual se encuentra dentro del rango fisiológico esperado para estos tipos de tamaños que es de 0.5 y 3.5 ml. Este valor puede verse alterado debido a problemas reproductivos, problemas testiculares como hipoplasias o eyaculaciones incompletas, por otra parte, un volumen de semen canino exageradamente elevado puede deberse a la mezcla con fracción la fracción pre-espermática o de una contaminación prostática (World Veterinary Journal, 2022).

El color del eyaculado seminal debe ser de matices cercanos al blanco ópalo o blanco perlado, ser homogéneo y sin presencia de grumos, si llegaran a existir apariencia de tonos rojizos, amarillos o incluso verdosos, se puede considerar esto como apariencia de hemospermia o presencia de contenido urinario o alguna patología distinta, en cambio que si llegara a existir la presencia de filamentos o grumos en la muestra seminal puede indicar que existe secreciones anormales o de células inflamatorias, dentro de este parámetro en estudios realizados en caninos de la raza “Kintamani”, el color típico de las muestras seminales fue el de “blanco lechoso”, lo cual concuerda con parámetros visuales normales de un eyaculado fisiológico (World Veterinary Journal, 2022; Meynard Flores y Torrez Calero, 2022)

La consistencia normal de un eyaculado debe ser intermedio y homogénea, si llegara a existir una consistencia demasiado líquida podría indicar que existe un bajo número espermático o que existe una contaminación de la muestra, por otra parte si llegara a encontrarse una muestra muy espesa dificultaría la dilución y la manipulación de la muestra en el proceso de la crioconservación, en el estudio de los caninos de raza “Kintamani” se reportó que una consistencia considerada “espesa” es apropiada para la reproducción asistida (World Veterinary Journal, 2022).

2.2.3. Parámetros microscópicos del eyaculado canino.

Luego de haber realizado el análisis macroscópico del semen canino, se realiza el análisis microscópico, el cual viene a ser la herramienta más importante en lo que se refiere a la calidad espermática del eyaculado canino. Aquí se analiza en directo las características funcionales de los espermatozoides como son su capacidad de movimiento, la viabilidad celular, y la integridad de los mismos, todos estos nos dan un pronóstico para definir el potencial de fecundación del semen recolectado. Los parámetros que se incluyen aquí son aquellos que incluyen la motilidad espermática total y progresiva, la viabilidad espermática, la morfología y la concentración espermática, cada uno de estos se ajustan criterios de interpretación, los cuales deben ajustarse a valores de referencia establecidos por estudios clínicos de cada estudio (Crepaldi et al., 2024).

Motilidad espermática. La motilidad espermática en el semen canino constituye un parámetro fundamental para evaluar su funcionalidad reproductiva, este indicador se emplea con frecuencia para evaluar el potencial de fecundación del eyaculado. Su análisis se basa en la determinación del porcentaje de células espermáticas que presentan movimiento, diferenciándose dos formas principales: la motilidad masal, que comprende cualquier tipo de movimiento, y la motilidad progresiva, que hace referencia al avance efectivo del espermatozoide en trayectorias rectas o de trayectoria amplia. La importancia fisiológica de analizar este parámetro radica en que los espermatozoides deben recorrer el tracto reproductivo de la hembra luego de la inseminación o monta, por ende, que los espermatozoides tengan un movimiento progresivo es considerado un factor de predicción en lo que se refiere a la reproducción asistida (Meynard Flores y Torrez Calero, 2022; Crepaldi et al., 2024).

Así mismo Crepaldi et al. (2024) en estudios realizados establecieron que en el semen canino fresco la motilidad progresiva esta entre 70% y 90%, en cambio que la motilidad total puede llegar incluso alcanzar el 95% en animales jóvenes. Así mismo este porcentaje va a varias luego de la manipulación del semen fresco ya sea por un mal manejo de la muestra, problemas en el manejo de la temperatura durante el procesamiento, pero sobre todo en los procesos de refrigeración y congelación del semen canino.

La evaluación de este parámetro se lo realiza mediante microscopio óptico, con el uso de platinas de calor para mantener la temperatura normal de las muestras y que no sufran un cheque térmico que pudiera comprometer la muestra, con lentes de ampliación de 100x y 200x, este es un método que se ha venido implementando en clínicas y laboratorios de reproducción por su accesibilidad y rapidez. En un estudio realizado por Banchi et al. (2023) en el que compararon dos distintas técnicas de recolección de los espermatozoides (técnica de flotación epididimal vs. técnica de flushing) y su efecto sobre la calidad del semen canino tras la criopreservación en la que ellos incluyeron la motilidad espermática, encontraron que las condiciones de obtención y procesamiento del semen afecta directamente la motilidad espermática tras la congelación.

Viabilidad Espermática. La viabilidad espermática trata acerca del porcentaje de espermatozoides vivos en una muestra, en breves rasgos indica el grado de la integridad funcional de la membrana plasmática de los espermatozoides. La determinación es clave a que los espermatozoides inviábiles carecen de su respectiva capacidad de fecundación incluso si aún conservan su capacidad de fecundación. Esta se mide mediante el uso de tinción, especialmente la llamada eosina-nigrosina, la cual nos permite identificar células con membranas íntegras (viables, no teñidas) de aquellas con daño en su membrana celular (no viables, teñidas). El número de células espermáticas viables en semen fresco se encuentra normalmente por encima del 75% , cuando las células se encuentran comprometidas en su membrana celular generalmente se debe a varios factores como son el estrés oxidativo, la calidad del diluyente, un mal manejo de la temperatura al momento del procesamiento de las muestras, en el estudio realizado por Banchi et al. (2023) luego de la crioconservación epididimal, observaron un decrecimiento considerable en la viabilidad espermática especialmente en la técnica de flotación, por lo que sugieren que la técnica de obtención para la técnica de congelación influye en este parámetro de calidad espermática.

Por otra parte, en el estudio de Crepaldi et al. (2024) en la que analizaron 295 eyaculados de caninos, reportaron valores promedios de viabilidad de entre 75% y 90% cuyos valores diferían con respecto a la edad, calidad reproductiva y calidad general del eyaculado. Destacan que de existir una viabilidad superior al 80% se correlaciona de manera positiva con tasas elevadas de fertilidad de la muestra, con énfasis en si la fecundación se realiza mediante el uso de inseminación intrauterina, lo cual respalda la necesidad del uso de protocolos y el uso correcto de diluyentes que reduzcan en la medida de lo posible el daño de las células espermáticas.

Morfología Espermática .La morfología de las células espermáticas es un parámetro igual de importante que la motilidad y la viabilidad, ya que en esta entran las anomalías y alteraciones estructurales, ya sean en cabeza, pieza intermedia y cola, alteraciones a este nivel celular por sí mismos ya pueden comprometer la funcionalidad y la fertilidad del semen, la presencia de defectos celulares siempre va a estar presente en las muestras seminales, aun así si existe un aumento en estas

células aunque sea en un número reducido, se le ha asociado con una baja capacidad de penetración del ovocito lo que se traduce como una mejor tasa de gestación de las hembras (Sinagra et al., 2024).

En una publicación realizada este año por (Sinagra et al., 2024) en la que desarrollaron una base de datos anotada por especialistas en referente a imágenes de espermatozoides caninos, en la que usaron clasificación consensuada por dos médicos veterinarios determinaron que el porcentaje medio de espermatozoides normales morfológicamente es del 57% con defectos en cabezas (18%), la pieza intermedia (20%) y en cola (7%). Lo que evidencia los estándares estrictos con una mayor precisión en la clasificación morfológica y una correlación con la fertilidad.

Asimismo, en un estudio desarrollado por (Mitjana et al., 2022) ha demostrado que en condiciones de refrigeración prolongada del semen canino, esta temperatura tiene efectos directos sobre el aumento en las alteraciones morfológicas, especialmente si el diluyente usado no cuenta con antioxidantes o estabilizadores de membrana ya que evaluaron el efecto del fotoperiodo y la suplementación con melatonina el semen canino a refrigeración de 5 °C durante 6 días, observando que en periodos de fotoperiodo creciente, la inclusión de melatonina redujo los niveles acrosómicos y mejoró la estructura de los espermatozoides, lo cual subraya la importancia tanto de un control minucioso de la temperatura como del uso de crioprotectores en el diluyente usado que reduzca el deterioro morfológico de los espermatozoides caninos que se asocia al estrés oxidativo.

2.2.4. Métodos de análisis Seminal.

La aplicación de técnicas estandarizadas para el análisis del semen canino permite estimar con mayor precisión la calidad espermática y establecer el potencial reproductivo de un macho. Estas técnicas forman parte de un conjunto de pruebas de laboratorio denominado espermograma, el cual incluye parámetros macroscópicos (como volumen, color, viscosidad) y microscópicos (como motilidad, viabilidad y morfología, entre otros). En la presente investigación se emplearon métodos de evaluación seminal convencionales, tanto macroscópicos como microscópicos, los

cuales son usualmente utilizados en clínicas veterinarias con recursos logísticos de nivel medio, sin el uso de equipamiento técnico especializado en reproducción asistida.

En el caso de la motilidad espermática se puede realizar con microscopia óptica con portaobjetos temperados en platinas de calor, con estas herramientas y un entrenamiento preestablecido, se puede evaluar el equilibrio de espermatozoides móviles y su patrón de desplazamiento, lo cual permite establecer el grado de integridad práctico del flagelo espermático y la viabilidad general de la muestra. Aunque existen métodos avanzados como los sistemas CASA (Computer Assisted Semen Analysis), estudios recientes han validado la eficacia del análisis subjetivo cuando es realizado por observadores habituados a este análisis, especialmente en condiciones clínicas donde no se dispone de equipamiento técnico (Crepaldi et al., 2024).

La viabilidad espermática y la morfología pueden ser analizadas con tinción de eosina–nigrosina, dicha técnica permite distinguir espermatozoides vivos (no teñidos) de muertos (citoplasma teñido) en base a la integridad de la membrana plasmática. La observación se realiza al microscopio óptico a 1000× con aceite de inmersión en un microscopio óptico. Este procedimiento permite clasificar las anomalías morfológicas primarias (cabeza, pieza intermedia, cola) y secundarias (gota citoplasmática, colas enrolladas, etc.). La tinción eosina–nigrosina actualmente se sigue considerando un método confiable, accesible y útil tanto para laboratorios básicos como para estudios comparativos de semen crio conservado (Sinagra et al., 2024).

Si bien en varios estudios se utilizan técnicas añadidas como pruebas funcionales de integridad acrosomal, oxidación lipídica o fragmentación de ADN, en el presente trabajo se priorizó el uso de pruebas básicas y de bajo costo. Esto con el objetivo de comparar diluyentes seminales bajo condiciones clínicas reales, aplicables en escenarios veterinarios comunes y no necesariamente en contextos comerciales altamente especializados.

2.3. Métodos de crioconservación del semen canino

La crioconservación del semen canino se basa en técnicas estandarizadas para preservar la fertilidad de los espermatozoides a largo plazo, utilizando temperaturas extremadamente bajas por debajo de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Estas técnicas están diseñadas para reducir el daño durante las etapas críticas de la refrigeración, congelación y descongelación de las pajuelas, reduciendo así las alteraciones en la integridad de las membranas celulares, así como manteniendo la motilidad y viabilidad del espermatozoide (Ogata et al., 2025).

Entre los protocolos usados para la crioconservación, el más usado se organiza en tres etapas esenciales: primero, la refrigeración progresiva a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$; luego la congelación gradual usando nitrógeno líquido y finalmente una descongelación rápida mediante baño María. Durante la etapa de refrigeración, las muestras son diluidas con un extensor que contiene crioprotectores como glicerol y se estabilizan a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante varias horas para permitir que los espermatozoides se adapten gradualmente al descenso térmico y reducir así el riesgo de formación de cristales intracelulares. Posteriormente, el semen es colocado en pajuelas de distinto volumen, las cuales son inicialmente expuestas a vapores nitrogenados mientras están suspendidas a cierta altura sobre su superficie (generalmente entre 1 y 10 cm) por unos minutos antes del almacenamiento total sumergido completamente en nitrógeno líquido (-196°C). Finalmente, para descongelar, las pajuelas se sumergen brevemente en un baño María ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por unos segundos), lo que permite una reacción óptima de los espermatozoides tras el choque térmico (Ogata et al., 2025).

2.4. Diluyentes

Los diluyentes son mezclas completas para preservar la funcionalidad, viabilidad y estructura de los espermatozoides durante procesos como la refrigeración o la criopreservación. Son esenciales en biotecnologías reproductivas tales como la inseminación artificial y la conservación genética, ya que proporcionan una barrera física y química que protege a los espermatozoides contra las condiciones adversas del procesamiento. (Sharafi et al., 2022)

2.4.1. Funciones generales del diluyente: protección, nutrición y estabilización.

Una de sus principales funciones es la protección osmótica y térmica. Durante los procesos de refrigeración o congelamiento, los cambios de temperatura y presión osmótica pueden generar estrés osmótico, daño en la membrana plasmática y formación de cristales de hielo intracelulares. Tiene como función contrarrestar estos efectos al contener crioprotectores permeables (como el glicerol o DMSO) que penetran la célula y equilibran la salida de agua de la membrana, así como no permeables (como la yema de huevo, leche o la lecitina de soya) que actúan externamente estabilizando la membrana espermática. Además, incluyen sistemas de buffer para regular el pH, fuentes energéticas como azúcares simples, y agentes antioxidantes para minimizar la peroxidación lipídica (Bustani y Baiee, 2021).

Además, los diluyentes desempeñan un papel nutricional importante al ofrecer azúcares como la glucosa o fructosa. Estos compuestos son utilizados por los espermatozoides como fuente de energía para mantener su metabolismo y movilidad durante el almacenamiento, especialmente en condiciones de refrigeración o congelación. Se ha comprobado que añadir fructosa a estos diluyentes es mejor que utilizar glucosa para conservar la motilidad espermática en el tiempo, favoreciendo así el metabolismo anaeróbico elevado en los espermatozoides caninos. Asimismo, estos azúcares contribuyen a disminuir la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), cuya acumulación puede provocar peroxidación lipídica y daño al ADN del espermatozoide, afectando negativamente la fertilidad (Sharma et al., 2022).

Los agentes diluyentes constan de sistemas tampón como TRIS o citrato de sodio los cuales juegan un papel crucial en la regulación del pH durante el almacenamiento. Por lo tanto, son esenciales para preservar la integridad de las membranas espermáticas y mantener la funcionalidad celular. (ScienceDirect Topics, 2025). Además, suelen incluir antibióticos como gentamicina o penicilina, cuya finalidad es prevenir el crecimiento bacteriano sin afectar de manera significativa la movilidad o morfología espermática. No obstante, algunos estudios han señalado efectos menores en ciertos parámetros que miden el movimiento espermático (Ortiz-Rodríguez et al., 2022).

Por último, pero no menos importante, la adición de antioxidantes como el ácido ascórbico, glutatión, isospintanol o ergothioneína en diluyentes TRIS-yema ha señalado mejorar la viabilidad después de la descongelación además que ayuda a disminuir el daño por peroxidación lipídica. Esto ayuda a preservar tanto la integridad del acrosoma como la estructura del ADN favoreciendo la tolerancia a la crioconservación (Usuga et al., 2021).

2.4.2. Yema de huevo como crioprotector

La yema de huevo es un crioprotector no permeable ampliamente utilizado en la crioconservación del semen canino, bovino, y en otras muchas especies, normalmente se añade (en concentraciones de entre 5% al 20%) a los diluyentes para proteger los espermatozoides del choque térmico inicial durante la refrigeración y del daño que ocurre en la congelación. Su eficacia como crioprotector en mamíferos ha sido bien documentada durante muchos años, y sus componentes principalmente las lipoproteínas de baja densidad (LDL) presentes en la yema desempeñan un papel crucial en esta acción protectora sobre los espermatozoides. Esta fracción de las LDL es reconocida como el componente activo principal responsable del efecto protector que ejerce la yema sobre los espermatozoides (Swelum et al., 2022; Chang et al., 2025)

La yema de huevo está compuesta en gran medida por lípidos y proteínas, lo que le da su capacidad crio protectora. Aproximadamente un 33% de la yema se concentra en lípidos como triglicéridos, colesterol y fosfolípidos; esta última categoría es especialmente rica e incluye principalmente fosfatidilcolina o lecitina, seguida por fosfatidiletanolamina, esfingomielina entre otros (Abeyrathne et al., 2022).

Función de la yema de huevo como crioprotector.

Protección de las membranas espermáticas: Las moléculas LDL presentes en la yema se adhieren a la superficie del espermatozoide e interactúan con los lípidos de su membrana plasmática, creando una capa protectora extra. Esto impide que se pierdan fosfolípidos y colesterol durante el enfriamiento rápido en la crioconservación, preservando así la estabilidad estructural (Mahiddine y Kim, 2021).

En el semen canino, se ha observado que las lipoproteínas de baja densidad (LDL) que están en la yema de huevo pueden unirse y secuestrar proteínas del plasma seminal, estas proteínas normalmente inducirían una extracción prematura de colesterol de la membrana espermática, desestabilizándola a través de un proceso conocido como "capacitación". Al prevenir este flujo saliente de colesterol y evitar la hiper-fosforilación asociada con dicha capacitación, las LDL contribuyen a mantener tanto la integridad como la fluidez de las membranas espermáticas durante el procedimiento de congelación. (Chang et al., 2025)

Prevención del daño causado por cristales de hielo: Durante el proceso de congelación espermática, se forman cristales de hielo dentro y fuera de las células debido al agua. Estos cristales pueden dañar estructuras celulares delicadas. Los crioprotectores no permeables como la yema de huevo aumentan la viscosidad del medio y reducen así la formación de grandes cristales, tanto dentro como fuera de la célula, evitando que el agua precipite en formaciones de cristales, Además, los fosfolípidos presentes en la yema pueden incorporarse a las membranas espermáticas ya que amortiguan los cambios rápidos durante el enfriamiento o descongelamiento. Este efecto ayuda a mitigar cualquier posible daño físico ocasionado por los microcristales sobre dichas estructuras (Chang et al., 2025).

Propiedades antioxidantes: La yema de huevo contiene antioxidantes naturales, como la vitamina E, carotenoides y glutatión, los cuales ayudan a neutralizar radicales libres producidos durante el proceso de la congelación y la descongelación. Esto disminuye la peroxidación lipídica en los ácidos grasos de la membrana plasmática y protege las células del estrés oxidativo, contribuyendo a mantener la viabilidad espermática después de ser descongeladas (Chang et al., 2025).

Mantenimiento de la integridad celular tras la descongelación: El uso de yema de huevo en los diluyentes mejora notablemente la proporción de espermatozoides viables e intactos al descongelarlos. Numerosos estudios como los de (Chang et al., 2025) y (Swelum et al., 2022) han mostrado que incluir yema o sus componentes en medios crioprotectores optimiza los parámetros post-descongelación como motilidad, integridad de la membrana plasmática, además reduce el porcentaje dañado eliminando las partículas donde se observó un incremento significativo en integridad

de la membrana y acrosoma de los espermatozoides post-descongelación comparado con grupos control.

2.4.3. Función del glicerol como crioprotector

El uso de crioprotectores permeables es fundamental para conservar la fertilidad del semen durante el proceso de la congelación. El glicerol se destaca de entre estos como uno de los principales además que es considerado como el más eficaz crioprotector permeable empleado. Este compuesto de bajo peso molecular tiene la capacidad de penetrar en espermatozoides y reemplazar parte del agua intracelular, lo cual, ayuda a minorar los daños causados por la formación interna del hielo en las células. (Sharafi et al., 2022)

Durante el proceso de congelación, las células enfrentan dos tipos de daños: la formación de cristales de hielo y el estrés osmótico, esto debido a cambios bruscos en la concentración de los solutos. El glicerol ayuda a atenuar ambos efectos mediante diversos mecanismos complementarios. Primero, gracias a su permeabilidad, penetra dentro del espermatozoide y reemplaza parte del agua intracelular. Esto reduce la cantidad de agua libre que podría cristalizar dentro de las células, reduciendo así el riesgo mortal asociado con los cristales internos. En segundo lugar, al aumentar la concentración total de solutos en el medio durante su uso como “agente crioprotector no iónico” ya que baja el punto de congelación del líquido y atenúa la concentración de las sales cuando el agua se congela (Sharafi et al., 2022).

Además, el glicerol juega un papel crucial en la estabilidad de las membranas en la congelación, al ingresar y equilibrarse a través de la membrana celular, este facilita una deshidratación progresiva y controlada a temperaturas más bajas, lo que permite que los lípidos y proteínas dentro de la membrana espermática se reorganicen mejorando así su estructura. Este reordenamiento junto con el aumento en la fluidez dentro de la bicapa lipídica evita cambios bruscos entre las fases mientras preserva intacta su integridad estructural (Sharafi et al., 2022).

Es importante destacar que el proceso de adición y eliminación del glicerol presenta desafíos osmóticos, los cuales requieren un manejo cuidadoso. Al exponer al

semen a un medio con alta concentración de glicerol, los espermatozoides experimentan cambios drásticos en su volumen ya que tienden a encogerse rápidamente debido a la pérdida de agua hacia el entorno hipertónico y luego de eso se expanden gradualmente conforme el glicerol entra en las células equilibrando la osmolaridad. Estas variaciones de volumen pueden ser perjudiciales si ocurren bruscamente, ya que contracciones y expansiones excesivas pueden dañar la membrana celular, memorar la motilidad e incluso comprometer la integridad del acrosoma. Por este motivo, es habitual incorporar progresivamente el glicerol para dar tiempo suficiente a las células para que puedan ajustar su volumen sin enfrentar cambios osmóticos severos.

Afortunadamente, los espermatozoides poseen mecanismos fisiológicos para regular su volumen, lo que ayuda en el proceso de congelación como la presencia de canales tipo acuaporinas en la membrana, estas acuaporinas permiten una salida controlada de agua durante el proceso de congelamiento y facilitan también la entrada de glicerol dentro de las células. Las acuagliceroporinas son subtipos específicos permeables al glicerol y actúan como vías rápidas para equilibrar osmólitos entre el interior y exterior celular, mejorando así la tolerancia osmótica del espermatozoide (Schäfer-Somi et al., 2022).

2.4.4. Antibióticos

En la conservación de semen común añadir antibióticos al diluyente con el objetivo de controlar el crecimiento bacteriano. En especies menores se suelen utilizar antibióticos tales como gentamicina, penicilina y estreptomina en los diluyentes seminales o durante la criopreservación, estos compuestos ayudan a prevenir la contaminación bacteriana, su uso no terapéutico ha sido cuestionado debido al riesgo de promover resistencia antimicrobiana y posibles efectos adversos sobre la calidad del esperma.

Sin embargo, el uso habitual de antibióticos en diluyentes para criopreservación debe manejarse con cuidado. Esto se debe a que altas dosis de gentamicina (por ejemplo, alrededor de 1 mg/ml) han sido asociadas con efectos tóxicos sobre los espermatozoides durante la congelación. En un estudio veterinario

reciente realizado en ovinos, la gentamicina demostró ser muy eficaz inhibiendo el crecimiento bacteriano, sin embargo, tuvo peores resultados respecto a calidad del semen y fertilidad tras inseminación artificial, la motilidad total disminuyó y las tasas reproductivas fueron notablemente más bajas en comparación con otros diluyentes que contenían lincomicina-espectinomicina o penicilina-estreptomina (Lechner et al., 2023).

Este hallazgo sugiere que, aunque la congelación por sí misma reduce significativamente la carga bacteriana, es crucial optimizar cuidadosamente tanto el tipo como la dosis del antibiótico para no comprometer la eficiencia de la criopreservación.

2.4.5. Azúcares

Los azúcares simples presentes en los diluyentes, son principalmente la glucosa y fructosa, las cuales actúan como sustratos metabólicos de rápida disponibilidad para la vía glucolítica del espermatozoide. Esto ayuda a mantener la producción de ATP y así preservar la motilidad celular durante períodos de refrigeración o congelación. Además, su presencia contribuye a controlar una generación excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS), al evitar que las células recurran a vías oxidativas más dañinas. Cuando se utilizan fuentes energéticas inadecuadas o insuficientes, tanto la movilidad del espermatozoide como su integridad de membrana disminuyen ampliamente entre 24 a 48 horas después del almacenamiento; sin embargo, incluir glucosa/fructosa permite que el porcentaje de motilidad supere el umbral clínico del 50 % limitando los procesos negativos como la peroxidación lipídica (Sinagra et al., 2024).

2.4.6. Antioxidantes

Los antioxidantes son componentes importantes en los diluyentes usados para criopreservación, ya que ayudan a neutralizar el estrés oxidativo provocado por el proceso de congelamiento y descongelamiento. Como ya se mencionó, los espermatozoides son particularmente susceptibles a las especies reactivas del oxígeno (ROS) debido a sus membranas ricas en ácidos grasos poliinsaturados. Estas pueden

causar peroxidación lipídica, fragmentación del ADN y pérdida de viabilidad celular, para minimizar estos efectos. Indeseables. (Mahiddine y Kim, 2021)

Por lo general, existen 2 principales grupos de antioxidantes:

Enzimáticos: Como el superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa, que actúan eliminando rápidamente radicales libres generados durante el proceso (Sharafi et al., 2022).

No enzimáticos: Como el ácido ascórbico, la vitamina “E”, melatonina y otras moléculas antioxidantes naturales, que refuerzan la protección celular contra el daño oxidativo (Mahiddine y Kim, 2021).

Estudios destacan que la adición de antioxidantes a los diluyentes, independientemente del compuesto específico utilizado, mejora la recuperación espermática después de ser descongelada. Esto se traduce en un aumento de la motilidad y una mejor integridad de las membranas celulares, así es como, en una reducción significativa de los marcadores asociados al estrés oxidativo o peroxidación lipídica hay evidenciación de sus efectos crioprotectores en caninos y otras domésticas (Mahiddine y Kim, 2021; Divar et al., 2022). Además, las revisiones actuales destacan que el uso adecuado de antioxidantes es una estrategia efectiva para reducir el daño celular durante la criopreservación siempre que sus concentraciones sean ajustadas según cada especie y protocolo empleado.

2.4.7. Sistemas buffer

El sistema Buffer desempeña un papel crucial al conservar el pH dentro de un rango fisiológico óptimo, que oscila entre 6.8 hasta 7.4, para conservar la viabilidad y funcionalidad del esperma. Durante la crioconservación, las variaciones de temperatura y los cambios osmóticos pueden modificar el pH de las muestras, y llega a afectar negativamente su metabolismo, así como su motilidad e integridad tanto a nivel de membrana plasmática como del acrosomal. Por lo tanto, cuando se trata de dilución para la crioconservación se utilizan comúnmente sustancias tampones como el TRIS (tris-hidroximetil aminometano) y citrato de sodio para estabilizar el pH durante todo el proceso de refrigeración y congelación (Kamal et al., 2022).

La adición de Tris junto con Citrato y Fructosa, a menudo combinado con yema de huevo y glicerol, ofrece tres beneficios principales:

- Regulación del pH al amortiguar cambios tanto durante el enfriamiento como en la descongelación.
- Regulación osmótica debido a la presencia de electrolitos como el citrato
- Estabilizar la membrana espermática a través de su interacción con los fosfolípidos. (Martínez Barbitta y Rivera Salinas, 2022)

Además, estudios actuales recalcan que, sin un buffer adecuado, el semen experimenta una acidificación o alcalinización drástica. Esta inestabilidad puede provocar efectos tóxicos indirectos que se reflejan en la pérdida de vitalidad y daños a las estructuras membranosas lo cual remarca que estas sustancias actúan como amortiguadores osmóticos y ayudan a prevenir este desequilibrio químico durante el proceso de congelación (Kamal et al., 2022).

2.4.8. Métodos de preservación de semen

Hay dos maneras de asegurar que el semen se conserve adecuadamente, ya sea a través de métodos naturales o mediante la aplicación de sustancias que ayuden a mantener su viabilidad para ser utilizado en la inseminación de las hembras.

Hipótesis y variables

2.5. Hipótesis:

No hay diferencias significativas en la efectividad de los tres diluyentes usados para la recolección de semen canino en términos de parámetros macroscópicos y microscópicos después de la criopreservación de semen canino para la implementación de un banco de germoplasma de alta genética.

2.6. Variables

Tabla 1

Operacionalización de la variable independiente y dependiente

Variable	Definición	Dimensión	Escala de medición	Técnica	Instrumentos
Diluyentes para semen canino (Variable independiente)	Solución líquida diseñada para diluir, conservar y proteger el semen de perros, permitiendo mantener su viabilidad, motilidad e integridad espermática durante su almacenamiento y uso en técnicas de reproducción asistida como la criopreservación	Tipo de diluyente	Nominal	Observación experimental	Hojas de campo, etiquetas, registros de protocolo
		Concentración y volumen	Cuantitativa continua	Medición en laboratorio	Pipetas graduadas, tubos de ensayo, pajuelas
		Eficiencia preservativa	Ordinal (alta, media, baja)	Evaluación seminal	Microscopio, tinción vital, cámara de recuento, semen

Variable	Definición	Dimensión	Indicadores	Escala de medición	Técnicas	Instrumentos	
Calidad seminal post-descongelación (Variable dependiente)	Conjunto de parámetros que determinan el estado funcional y estructural del semen canino tras su proceso de criopreservación y descongelación, evaluados mediante técnicas microscópicas.	Motilidad	Porcentaje de espermátos móviles	Cuantitativa continua	Observación directa	Microscopio, portaobjetos, aceite de inmersión	
			Viabilidad espermática	Porcentaje de espermátos vivos (eosina-nigrosina)	Cuantitativa continua	Tinción vital	Colorantes, portaobjetos, microscopio
			Morfología espermática	Porcentaje de espermátos normales.	Cuantitativa continua	Clasificación morfológica	Tinción vital, microscopio

CAPÍTULO III. DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA

3.1 Tipo, nivel y método de investigación

Se llevó a cabo un estudio aplicado con enfoque mixto que combinó las características s de los eyaculados y el análisis de los tratamientos. La fase experimental se realizó en 2024 en la clínica “Animal Planet”, Riobamba, Ecuador.

3.2 Población y muestra

La población estuvo compuesta por seis caninos clínicamente sanos (dos de razas grandes, dos de razas medianas y dos de razas pequeñas), cada perro aportó una eyaculación, que inmediatamente se dividió en tres alícuotas idénticas para asegurar que los tres diluyentes partieran de las mismas condiciones seminales.

Tabla 2

Materiales, reactivos y equipos empleados en el protocolo experimental

Tipo de material	Descripción específica
Biológicos	Semen de caninos de alta genética. Perros machos adultos, sanos. (6 caninos)
Reactivos químicos	Solución de eosina-nigrosina, Diluyentes
Materiales de laboratorio	Microscopio óptico con aumento 1000x y aceite de inmersión - Cámara de Neubauer, Portaobjetos y cubreobjetos, Tubos Falcon 15 ml y 50 ml, Pipetas automáticas (0.2–2 µl / 20–200 µl / 100–1000 µl) - Gradilla de tubos - Termómetro digital - Termostato de refrigeración 2–4 °C
Materiales para criopreservación	Pajuelas de 0.25 ml - Soportes de congelación (rack criogénico), Termo de nitrógeno líquido, Baño María digital 37 °C.
Material de protección y bioseguridad	Guantes de látex - Filipina - Solución desinfectante (alcohol 70% y ácido hipocloroso), Toallas desechables
Material administrativo	Hojas de registro de datos, esfero y etiquetas, etiquetadora de tinta para pajuelas, Reloj digital para cronometraje

Nota. Todos los reactivos se almacenaron y manipularon a 20 ± 2 °C. Las pajuelas cargadas se mantuvieron en nitrógeno líquido (-196 °C) hasta su uso, las medidas de volumen (μL , ml) se realizaron con pipetas calibradas

3.3 Diseño experimental

Tabla 3

Fases de evaluación seminal y variables analizadas

Fase	Descripción	Variables analizadas
Fresco (0 horas)	Evaluación del eyaculado antes de añadir diluyente.	Parámetros Macroscópicos, concentración.
Postdilución (0 horas)	Mezcla 1:1 con cada diluyente y evaluación inmediata en cámara de Neubauer.	Motilidad masal/individual, viabilidad, morfología.
Post-congelación (6 horas)	Congelación en pajuelas de 0,25 ml; primera descongelación a las 6 horas	Motilidad masal/individual, viabilidad, morfología.

3.4 Diluyentes evaluados.

Tabla 4

Composición cualitativa y cuantitativa de los diluyentes evaluados

Diluyente	Componente	Concentración
Diluyente 3	Tris (tris-aminometano)	2,42 g / 100 ml
	Ácido cítrico monohidratado	1,34 g / 100 ml
	Fructosa	1,00 g / 100 ml
	Glicerol	6,4–7 %
	Yema de huevo	19–20 %
	Antibióticos GTLS†	Gentamicina 0,4 mg / 100 ml, Tilosina 0,08 mg / 100 ml,

		Lincomicina + Espectinomicina (trazas) (Minitüb GmbH, 2014)
Diluyente 1	TRIS, citrato, fructosa, glicerol, gentamicina, antioxidantes, agentes estabilizadores)	El fabricante declara la fórmula cualitativa, pero no publica gramajes (Minitüb GmbH, 2024)
Diluyente 2	TRIS, glicerol, antibiótico, agentes estabilizadores	El fabricante declara la fórmula cualitativa, pero no publica gramajes. (Esch, 2014)

Nota. Composiciones obtenidas de las hojas técnicas de cada producto: (Minitüb GmbH, 2014), (Minitüb GmbH, 2024) y (Minitüb GmbH, 2024). GTLS corresponde a un cóctel antibiótico de gentamicina, tilosina, lincomicina y espectinomicina.

3.5 Procedimientos

Recolección del eyaculado.

- Se estimuló manualmente al macho hasta la protrusión del bulbo glandis

Figura 1

Ejemplar canino "Odín" durante la fase de estimulación previa a la recolección seminal.



Figura 2

Ejemplar canino "Jasper" durante la fase de estimulación previa a la recolección seminal



Se recogió únicamente la fracción espermática en el Funda de recolección de esperma canino.

Figura 3

Extracción mediante técnica manual en canino “Max”



Figura 4

Extracción mediante técnica manual en canino “Jasper”



Se procedió a la evaluación macroscópica inmediata con el registro del volumen, color (blanquecino, blanco lechoso, blanco transparente) y olor (neutro o fuerte).

Figura 5

Paso de semen fresco con micropipeta a tubo



Figura 6

Paso de semen fresco con jeringa de 1 ml a tubo



Se midió el volumen con tubos con graduación.

Figura 7

Registro de características macroscópicas y volumétricas



Evaluación microscópica inicial

Se realizó la homogenización de las muestras, se dividieron los eyaculados en 3 alícuotas y se realizó la dilución correspondiente de cada muestra con sus diluyentes en una dilución 1:1.

Motilidad espermática

Se mezclaron 2 μl de la muestra con 18 μl de solución salina tamponada (dilución 1:10) y se homogenizó suavemente. Se extrajeron 10 μl de semen diluido y se midió concentración.

Figura 8

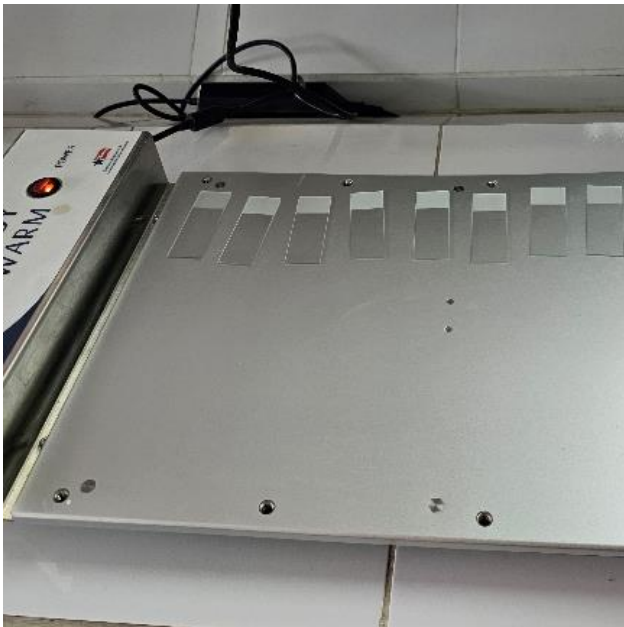
Recuento con cámara de Neubauer para medir concentración



Se cargaron 6 μ l sobre un portaobjetos precalentado a 37 °C; se colocó un cubreobjetos.

Figura 9

Placa calefactora con portaobjetos con la muestra seminal.



El portaobjetos se colocó en la platina calefactada del microscopio; a 100 \times se evaluó la motilidad masal, asignando un puntaje de 0 a 5 según la intensidad de las

ondas. Se aumentó a 400× y se contaron 200 espermatozoides en tres campos aleatorios, registrando el porcentaje de móviles totales y de móviles progresivos.

Figura 10

Análisis seminal (400x).



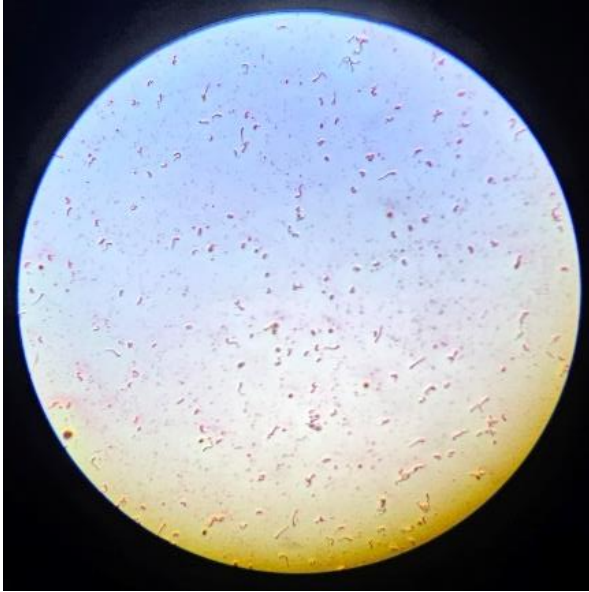
En el estadio de análisis postcongelación se promediaron los valores de los tres campos y se calculó la pérdida de motilidad comparando con la fase postdilución.

Viabilidad espermática

- Se mezclaron 10 µl de semen con 10 µl de eosina-nigrosina a 37 °C y se esperaron 30 s para la penetración del colorante.
- Se extendieron 5 µl de la mezcla en un portaobjetos, se realizó un frotis y se dejó secar al aire sobre la placa calefactora (37 °C).
- Bajo el objetivo de 1000× con aceite de inmersión se clasificaron 200 células: vivas (cabeza incolora) y muertas (cabeza rosada)

Figura 11

Análisis seminal con eosina–nigrosina.



- Se calculó el porcentaje de viables con la fórmula “ $V = (vivas / 200) \times 100$.”

Morfología espermática

- En el mismo frotis eosina-nigrosina se revisaron los 200 espermatozoides ya contados.
- Se identificaron anomalías primarias (cabeza, pieza intermedia, cola) y secundarias (gota citoplasmática distal, cola doblada, etc.)

Figura 12

Análisis seminal de morfología.



- Se registró el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales y la distribución de defectos tanto en postdilución como en postcongelación.

Control

- Para cada alícuota se prepararon dos frotis y dos láminas de motilidad; si el coeficiente de variación entre las muestras superaba el 10 %, se repetía el conteo.

Empajuelado, refrigeración y congelación de las muestras

- Se procedió al llenado de las pajuelas previamente ya etiquetadas con la información del diluyente usado, la fecha y el nombre del canino con un volumen de 0,25 ml dejando burbuja de aire de 0,5 cm.

Figura 13

Pajuelas de almacenamiento etiquetadas

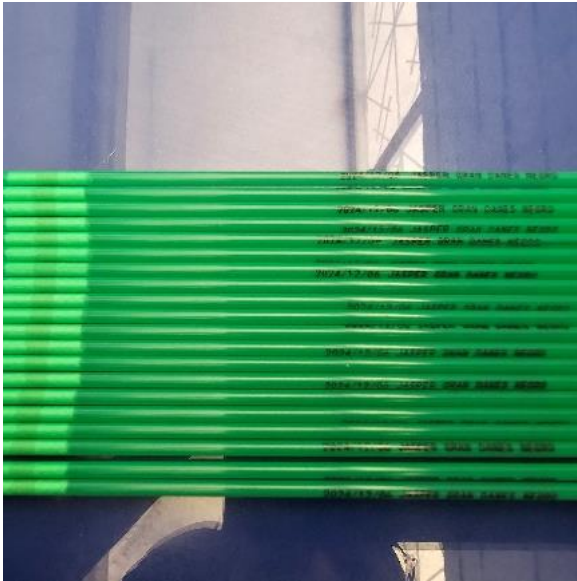
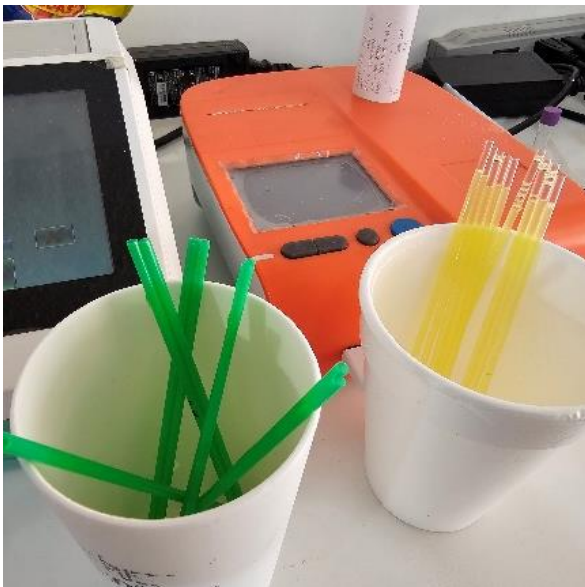


Figura 14

Llenado de pajuelas con el semen diluido



- Se realizó el sellado de las pajuelas con ácido poliglicólico.

Figura 15

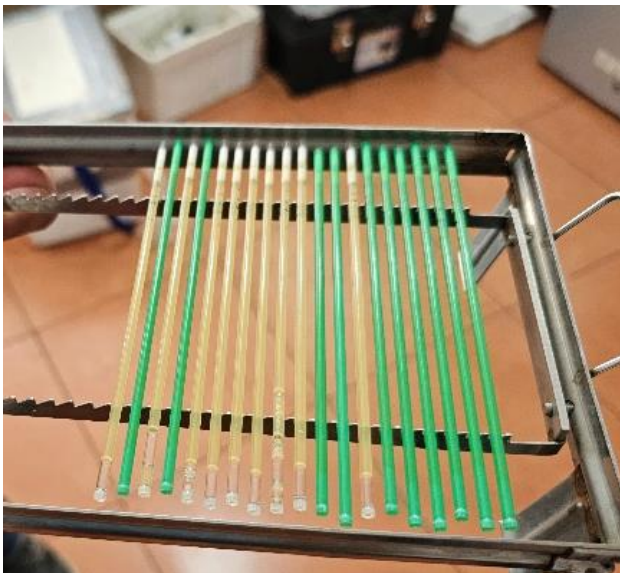
Sellado de las pajuelas



- El Enfriamiento controlado se realizó primero refrigerando las pajuelas 2 horas a 4 °C en un refrigerador previamente calibrado para solo el uso del estudio con un termómetro digital externo con máximas y mínimas.

Figura 16

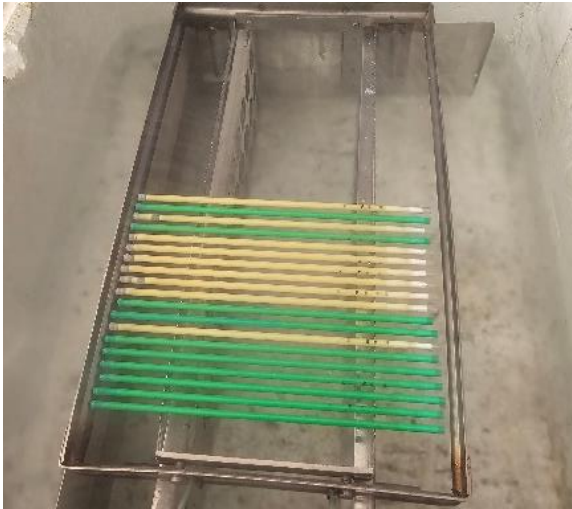
Pajuelas antes de meter a refrigeración



- Pasado el periodo de refrigeración se extrajo las pajuelas y se colocó a 10 cm sobre la superficie de nitrógeno líquido durante 10 a 12 minutos.

Figura 17

Pajuelas expuestas a vapores de nitrógeno



- Inmediatamente pasado este tiempo se sumergió las pajuelas al contenedor de nitrógeno líquido ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Figura 18

Pajuelas lanzadas al contenedor con nitrógeno líquido

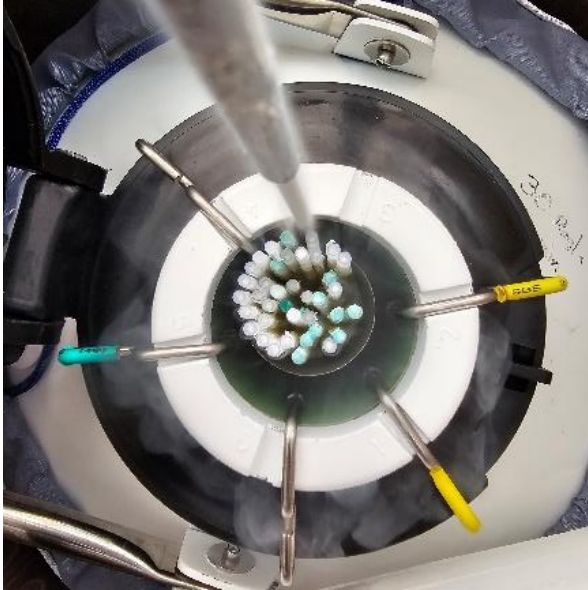


Almacenamiento de las muestras.

- A las pajuelas se les mantuvo en posición vertical dentro de canastillas en un termo de 30 litros específico para semen canino.

Figura 19

Pajuelas en el termo de nitrógeno líquido ya almacenadas



- Se realizó comprobaciones semanales de los niveles de nitrógeno líquido y se realiza llenado si llegara a ser necesario.
- Descongelación para análisis post congelación a las de 6 horas del almacenado.
- Se extrajeron de 2–3 pajuelas por tratamiento usando pinzas de los termos de criopreservación y se sumergió las pajuelas en baño María a 37 °C durante 50 a 60 segundos.
- Se secó y se cortó el extremo sellado y se vertió el contenido en tubo estéril tibio.
- Evaluación post-descongelación
- Se repitió la medición de la motilidad masal, motilidad individual, viabilidad y morfología siguiendo los mismos métodos descritos anteriormente.

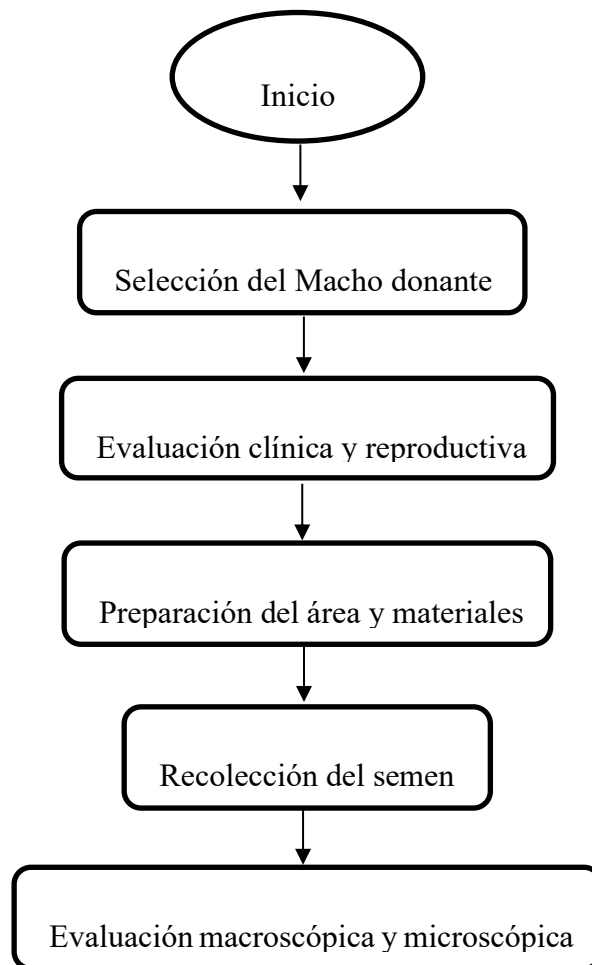
Tabla 5

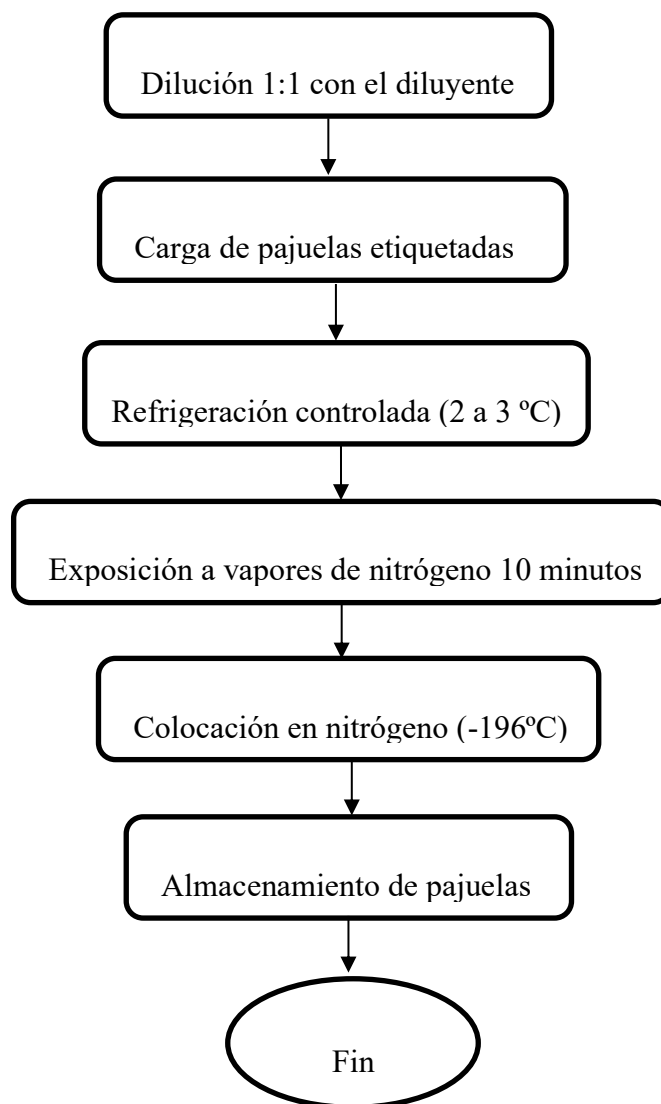
Escala de puntuación de motilidad masal del semen canino

Puntos	Porcentajes	Descripción
5	90%	Ondas rápidas
4	70-85%	Movimiento vigoroso
3	45-65%	Bajo movimiento de ondas
2	20-40%	Ausencia de ondas
1	10%	Solo el 10% muestra vitalidad
0	0%	No existe ningún tipo de movimiento en la muestra

Nota. Tabla adaptada de (Bencharif et al., 2025). Se evaluó la motilidad masal en portaobjetos precalentados a 37 °C con microscopio de contraste de fases (100×).

Organigrama de procesos





3.6 Plan de recolección

Las colectas se realizaron en la segunda y tercera semana de diciembre 2024, periodo de máxima disponibilidad de los donantes.

3.7. Análisis estadístico

Los datos se procesaron en InfoStat ®; se aplicó un ANOVA completamente al azar (ADEVA) para cada variable, seguido de la prueba de Tukey 5 %, replicando el procedimiento descrito en el Capítulo III.

3.1.1. Fase de investigación

Para obtener información relevante y actualización sobre el tema de estudio, se realizó una búsqueda exhaustiva de fuentes académicas y científicas. Se utilizaron bases de datos académicas y bibliotecas digitales reconocidas, como: Scielo, Google Académico, y bibliotecas universitarias en línea. La búsqueda se limitó a:

Artículos Científicos: Se buscaron artículos científicos publicados en revistas académicas y científicas. La fecha de publicación de estos artículos no será mayor a 5 años a partir del año actual y algunos de 10 años a la fecha actual.

Tesis de Maestría y Doctorado: Se buscaron tesis de maestrías y doctorado relacionadas con el tema de la investigación. En su mayoría son tesis que han sido defendidas y publicadas en los 5 últimos años y algunas de 10 años a la fecha del año actual.

La busque se realizó utilizando palabras claves y términos relevantes relacionados con la criopreservación de semen canino, los tipos de medios utilizados y los parámetros de evaluación postcongelación. Se considero publicaciones en inglés y en español para obtener una perspectiva más completa.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

4.1 Características macroscópicas del semen canino

Tabla 6

Parámetros macroscópicos del eyaculado canino fresco.

Caninos		Volumen (ml)	Color	Olor	Concentración (millones x ml)
Pequeño	1 ODIN	1	Blanquecino	Neutro	124
	2 COOPER	1,6	Blanco transparente	Neutro	320
Mediano	3 MAX	8	Blanco lechoso	Neutro	610
	4 KAI	8,5	Blanquecino	Neutro	850
Grande	5 JASPER	10	Blanco transparente	Neutro	530
	6 ARTHUR	20	Blanco lechoso	Fuerte	860
Promedio		8.18			549

Los resultados indican una relación evidente entre el tamaño corporal del perro y las características macroscópicas de su eyaculado. Los perros más grandes mostraron mayores volúmenes (hasta 20 ml) y altas concentraciones espermáticas (hasta 860 millones/ml), mientras que los perros más pequeños presentaron volúmenes reducidos (1 a 1.6 ml) con menores concentraciones. Estos hallazgos son consistentes con lo señalado por (Crepaldi et al., 2024), quienes sostienen que factores como el peso, la raza y la edad del macho afectan considerablemente tanto la cantidad como la calidad del eyaculado.

El color del semen varió desde un blanco lechoso hasta tonos blanquecinos o transparentes, siendo este último el más común en muestras con menor concentración. Esto coincide con lo señalado por (Bustani y Baiee, 2021), quienes indican que una tonalidad opaca se asocia a una mayor densidad espermática, mientras que colores más claros reflejan una menor carga espermática. En cuanto al olor, la mayoría de las muestras fueron neutras, excepto un caso que presentó un olor fuerte posiblemente relacionado con mayor actividad prostática sin relación patológica.

Los valores promedio registrados, 8.18 ml de volumen y una concentración de 549 millones/ml, se encuentran dentro del rango fisiológico normal para el semen canino según lo establecido por (Puerto Belta, 2021). Esto sugiere que las muestras recolectadas son de buena calidad y son aptas para los procesos de criopreservación.

4.2 Evaluación de las características microscópicas del semen canino post dilución con los tres diluyentes.

En términos de motilidad masal, el diluyente tres logró los valores promedio más altos (aproximadamente 81–83%), en comparación con el 71.5% obtenido con el diluyente uno y entre 69.5 y 71.5% con el diluyente dos. Esta mejora se puede atribuir a la composición lipídica del diluyente tres, que contiene yema de huevo; un componente rico en lipoproteínas de baja densidad (LDL) que protege las membranas espermáticas durante situaciones de estrés térmico (Abeyrathne et al., 2022; Bustani y Baiee, 2021).

Estas lipoproteínas ayudan a estabilizar la estructura celular y disminuyen la pérdida de motilidad asociada a la manipulación después del eyaculado. La motilidad individual se calificó como buena en todos los grupos. Sin embargo, para las razas grandes y medianas con el diluyente tres, se describió como "muy buena", lo que destaca su mayor capacidad de conservar la funcionalidad. Este patrón es consistente con los hallazgos de (Nazeri et al., 2022), quienes reportaron que agregar yema o sus fracciones mejoraba significativamente el avance espermático comparado con otros componentes.

Tabla 7

Características microscópicas del semen canino post dilución con el diluyente uno

Razas	Motilidad		Morfología (%)	Viabilidad (%)
	Masal (%)	Individual		
Grande	73 ± 3	Buena	82.5 ± 3	65.5 ± 1
Mediana	70.5 ± 1	Buena	76.5 ± 3	64 ± 2
Pequeña	70 ± 3.5	Buena	76.5 ± 3	67 ± 5
Promedio				65.5

En cuanto a la morfología espermática, todos los diluyentes mantuvieron porcentajes dentro del rango fisiológico (>75%), siendo el diluyente número tres nuevamente el más favorable con valores de hasta 85%. Según (Crepaldi et al., 2024), contar con una morfología normal superior al 70% es un criterio aceptado para considerar que el eyaculado es adecuado para fines reproductivos. La conservación morfológica observada en este estudio indica que ninguno de los diluyentes causó daño estructural severo, lo cual resulta crucial para asegurar la fertilidad.

Tabla 8

Características microscópicas del semen canino post dilución con el diluyente dos

Razas	Motilidad		Morfología (%)	Viabilidad (%)
	Masal (%)	Individual		
Grande	71.5 ± 2.5	Buena	80 ± 1	66.5 ± 2
Mediana	71.5 ± 1.5	Buena	75 ± 4	64.5 ± 1
Pequeña	69.5 ± 2.5	Buena	77.5 ± 3	66.5 ± 2
Promedio				65.83

Tabla 9

Características microscópicas del semen canino post dilución con el diluyente tres

Razas	Motilidad		Morfología	Viabilidad
	Masal (%)	Individual		
Grande	83 ± 3	Muy buena	85 ± 3	75.5 ± 1
Mediana	81.5 ± 2	Muy buena	84.5 ± 3	74.5 ± 2
Pequeña	78 ± 2	Buena	82.5 ± 2	72 ± 1.5
Promedio				74

En relación con la viabilidad espermática, el diluyente tres logró el promedio más alto (74%), seguido por el diluyente dos (65.83%) y luego el diluyente uno (65.5%). Estos resultados indican que la formulación del tercer diluyente proporciona una mejor protección contra el estrés osmótico y oxidativo después de la dilución. Como señalan (Mahiddine y Kim, 2021) en su estudio, incorporar ingredientes antioxidantes y protectores de membrana, como la yema de huevo, mejora significativamente la integridad celular.

4.3. Evaluación de las características microscópicas del semen canino post descongelamiento con los tres diluyentes

El proceso de criopreservación reduce la calidad del espermatozoides como resultado del estrés osmótico, daños térmicos y generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) durante el congelamiento y el descongelado. Estos efectos impactan particularmente en la motilidad y viabilidad espermática según (Mahiddine y Kim, 2021; Bustani y Baiee, 2021).

Todos los diluyentes analizados conservaron la calidad del espermatozoides dentro de parámetros adecuados para la inseminación artificial, aunque también observaron diferencias significativas entre ellos.

El diluyente número tres, que contiene yema de huevo, mostró los mejores resultados tras la descongelación. Se registró una motilidad masal promedio del 70.8%, con morfología entre el 74.5% y el 77.5%, y una viabilidad del 69.5%. Estos valores fueron superiores a aquellos obtenidos con los diluyentes uno y dos. Este hallazgo es consistente con lo informado por (Abeyrathne et al., 2022; Nazeri et al., 2022), quienes señalan que las lipoproteínas de baja densidad (LDL) presentes en la yema protegen las membranas espermáticas durante el estrés térmico, minimizando así el daño estructural e incrementando la preservación de la motilidad.

Tabla 10

Características microscópicas del semen canino post descongelamiento con el diluyente uno

Razas	Motilidad		Morfología (%)	Viabilidad (%)
	Masal (%)	Individual		
Grande	67.5 ± 3	Buena	72.5 ± 3	55.5 ± 1
Mediana	64.5 ± 1	Buena	71 ± 3	53.5 ± 2
Pequeña	64.5 ± 2	Buena	70.5 ± 2	57 ± 4
Promedio				55.33

Por otro lado, el diluyente dos, que no contiene yema de huevo, mostró los valores más bajos después del proceso de descongelación: una motilidad masal cercana

al 62.5%, morfología reducida a un 69.5% en razas pequeñas y viabilidad promedio del 49.66%. Esto indica que la falta de un agente protector lipídico efectivo podría haber dejado a los espermatozoides más vulnerables al daño en la membrana durante el congelamiento, como se ha indicado en estudios recientes (Mahiddine y Kim, 2021) y (Schäfer-Somi et al., 2022)

Tabla 11

Características microscópicas del semen canino post descongelamiento con el diluyente dos

Razas	Motilidad		Morfología (%)	Viabilidad (%)
	Masal (%)	Individual		
Grande	62.5 ± 2	Buena	72.5 ± 2	51.5 ± 2
Mediana	62.5 ± 2	Buena	71.5 ± 3	49.5 ± 2
Pequeña	63 ± 3	Buena	69.5 ± 2	48 ± 2
Promedio				49.66

Tabla 12

Características microscópicas del semen canino post descongelamiento con el diluyente tres

Razas	Motilidad		Morfología (%)	Viabilidad (%)
	Masal (%)	Individual		
Grande	71.5 ± 2.5	Buena	77.5 ± 2	71.5 ± 1
Mediana	71.5 ± 2	Buena	74.5 ± 3	69.5 ± 2
Pequeña	69.5 ± 3	Buena	75.5 ± 3	67.5 ± 2
Promedio				69.5

El diluyente uno, con una motilidad promedio del 65.5% y viabilidad del 55.33%, mostró un rendimiento intermedio. Aunque su calidad fue aceptable, sus parámetros fueron inferiores a los del diluyente tres, en particular en la viabilidad donde hubo casi 14 puntos porcentuales de diferencia. Esta variación es significativa porque tener una mayor proporción de espermatozoides viables aumenta la probabilidad de éxito en las inseminaciones; esto resulta especialmente crucial para

programas de fertilización que utilizan dosis reducidas (Crepaldi et al., 2024). En términos generales, aunque todos los diluyentes permitieron una recuperación adecuada del semen después de la descongelación, el tercero mostró una capacidad superior de preservación. Esto se debe probablemente a su composición con yema de huevo, lo que respalda su uso preferente en protocolos para crio preservar semen canino.

4.4. Análisis de varianza ADEVA completa al azar para la variable motilidad masal en muestra de semen post descongelamiento y prueba de Tukey al 5%

Tabla 13

Análisis de Varianza ADEVA para la variable motilidad masal

F.V.	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrado Medio	p-valor
Modelo	206,33	2	103,17	<0,0001
Tratamiento	206,33	2	103,17	<0,0001
Error	39,67	15	2,64	
Total	246,00	17		

En la Tabla se presenta el análisis de varianza (ADEVA) realizado para la variable motilidad masal del semen canino post descongelación, aplicando tres tratamientos distintos (diluyentes). Los resultados muestran una diferencia altamente significativa entre los tratamientos ($p < 0.0001$), con un coeficiente de variación del 2,45%, lo que indica alta precisión experimental. La prueba de Tukey al 5% demostró que los tres diluyentes presentan diferencias estadísticamente significativas, conformando así tres grupos distintos.

El DT3 mostró la media más alta de motilidad masal con un valor del 70,83%, ubicándose en el grupo A; le siguió el DT1 con un promedio del 65,50% en el grupo B; y finalmente estuvo el DT2 con una media del 62,67%, perteneciente al grupo C.

Tabla 14

Prueba de Tukey al 5% aplicada a los tres diluyentes

Tratamiento	Medias	Rango de significancia
DT3	70,83	A
DT1	65,50	B
DT2	62,67	C

Los resultados estadísticos indicaron que el tipo de diluyente influye significativamente en la motilidad espermática después del proceso de descongelación. En particular, el diluyente tres (D3) demostró ser notablemente superior ($p < 0.0001$), con una media del 70.83%, superando a D1 y D2, cuyos valores fueron menores. Esta diferencia estadísticamente significativa fue corroborada por la prueba de Tukey al 5%, que distinguió cada tratamiento en grupos diferentes según su nivel significativo.

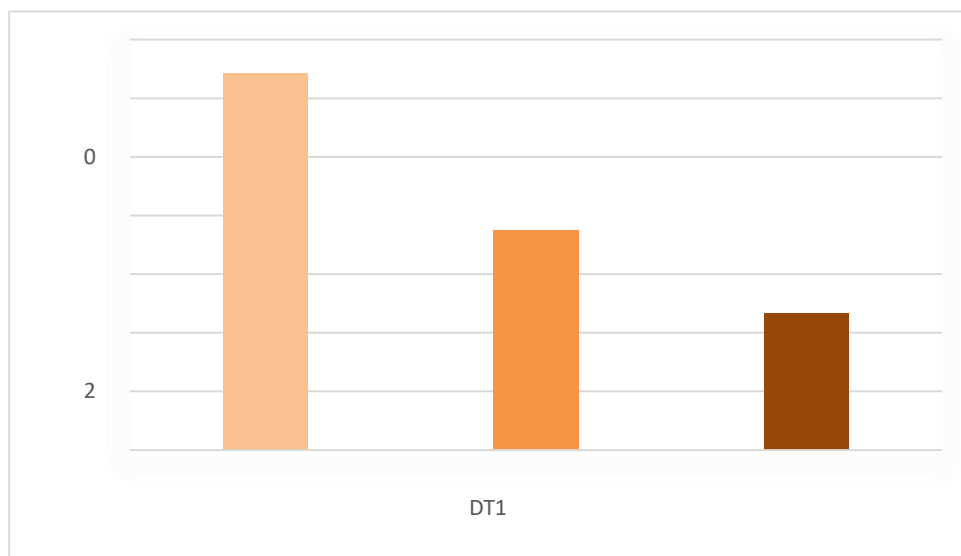
La efectividad superior del D3 se debe a su composición mejorada con yema de huevo y Tris, que le otorga una mayor capacidad para estabilizar la membrana espermática durante el proceso de congelación y descongelación. Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) presentes en la yema preservan la integridad estructural del espermatozoide y reducen al mínimo la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales están relacionadas con daños celulares después del deshielo (Abeyrathne et al., 2022; Mahiddine y Kim, 2021; Bustani y Baiee, 2021).

Por otro lado, aunque los diluyentes D1 y D2 mantuvieron niveles de motilidad superiores al umbral mínimo aceptable del 60% para la inseminación artificial según (Crepaldi et al., 2024), su eficacia fue considerablemente menor. Esto indica que, si bien son utilizables, no proporcionan la misma protección criogénica que el diluyente D3, especialmente en procesos con alta demanda reproductiva.

Es fundamental resaltar que estos descubrimientos coinciden con lo informado por (Nazeri et al., 2022; Schäfer-Somi et al., 2022), quienes registran que los diluyentes con contenido de yema de huevo suelen proteger la funcionalidad espermática más efectivamente que aquellos compuestos exclusivamente por componentes sintéticos o proteínas alternas.

Figura 20

Motilidad masal de los tres diluyentes



4.5. Análisis de varianza ADEVA completa al azar para la variable morfología en muestras de semen post descongelamiento y prueba de Tukey al 5%

La Tabla muestra el análisis de varianza (ADEVA) aplicado a la variable morfología espermática post descongelación, revelando diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, con un p-valor de 0.0001 y un coeficiente de variación del 2,02%, lo que indica alta confiabilidad y bajo error experimental.

Tabla 15

Análisis de varianza ADEVA para la variable morfología

F.V.	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrado medio	p-valor
Modelo	87,11	2	43,56	0,0001
Tratamiento	87,11	2	43,56	0,0001
Error	32,50	15	2,17	
Total	119,61	17		

El análisis de Tukey al 5% (ver Tabla 14) clasificó a los diluyentes en dos grupos significativos: Grupo A: Diluyente tres (DT3), con el promedio más alto de

morfología normal (75,83%); Grupo B: Diluyente uno (DT1) y diluyente dos (DT2), ambos con un promedio de 71,17%.

Tabla 16

Prueba de Tukey al 5% de la variable morfología

Tratamiento	Medias	Rango de significancia
DT3	75,83	A
DT2	71,17	B
DT1	71,17	B

Los resultados indican que el diluyente tres (D3), compuesto de yema de huevo y Tris, logró preservar mucho mejor la morfología normal del espermatozoide después de la descongelación en comparación con los otros dos diluyentes. Este hallazgo coincide con lo señalado por (Nazeri et al., 2022; Abeyrathne et al., 2022), quienes destacan que las lipoproteínas de baja densidad presentes en la yema se adhieren a la membrana celular del espermatozoide, protegiendo su estructura durante el enfriamiento y congelamiento.

En cambio, los diluyentes D1 y D2, aunque cumplen su función, mostraron un menor porcentaje de espermatozoides con morfología normal. Esto indica una capacidad reducida para proteger contra los daños osmóticos y térmicos. Según Crepaldi et al. (2024) se considera aceptable para la calidad seminal en perros un porcentaje de morfología normal del 70% o más; esta condición se cumplió en los tres tratamientos analizados a pesar de las diferencias significativas entre ellos.

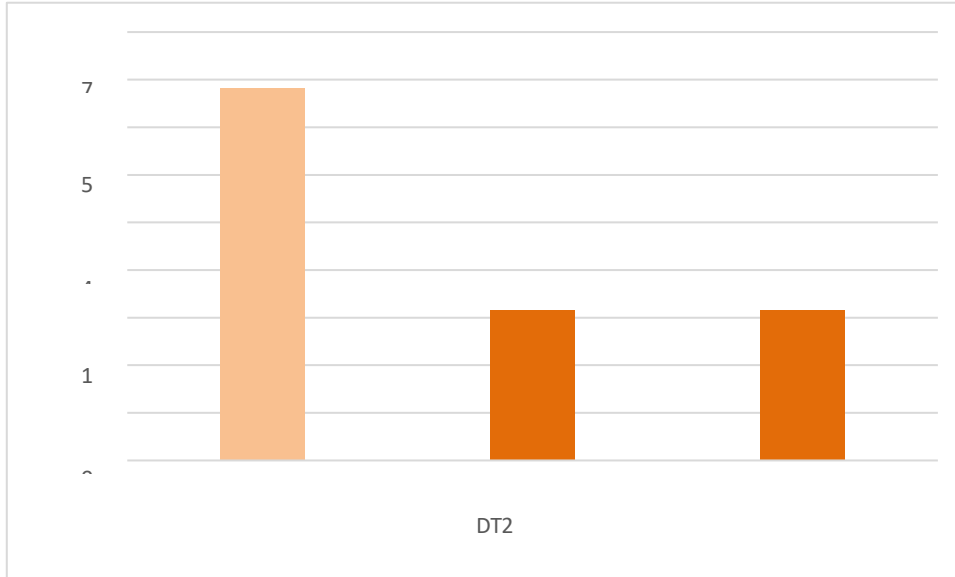
El D3 alcanzó un valor del 75.83%, superando con creces este umbral, y es importante destacar que una buena morfología es fundamental para el éxito de la fertilización, ya que los defectos estructurales pueden afectar la capacidad del espermatozoide para moverse y penetrar en el ovocito (Mahiddine y Kim, 2021).

Estos descubrimientos respaldan que el D3 proporciona una ventaja técnica evidente, no solo en términos de motilidad y viabilidad, sino también en la preservación de la integridad estructural de los espermatozoides después del proceso de criopreservación. La diferencia estadística con otros diluyentes confirma que la

composición del medio tiene un impacto directo sobre la calidad morfológica del semen tras su descongelamiento.

Figura 21

Variable Morfología



4.6. Análisis de varianza ADEVA completo al azar para la variable viabilidad en muestras de semen post descongelamiento y prueba de Tukey al 5%

El análisis de varianza (ADEVA) aplicado a la variable viabilidad espermática después del proceso de descongelación reveló diferencias altamente significativas entre los tres tratamientos examinados, con un p-valor inferior a 0.0001 y un coeficiente de variación del 4.25%, lo que demuestra una alta precisión experimental.

Tabla 17

Análisis de varianza ADEVA para la variable viabilidad

F.V.	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrado medio	p-valor
Modelo	1170,11	2	585,06	<0,0001
Tratamiento	1170,11	2	585,06	<0,0001
Error	92,33	15	6,16	
Total	1262,44	17		

La prueba de Tukey al 5% aplicado a los tres diluyentes determinó que existen tres grupos de significancia; el grupo A donde encontramos el diluyente tres (D3) con una media de 69,50, el grupo B donde se encuentra el diluyente dos (D2) con una media de 55,33 y el grupo C con el diluyente uno (D1) con una media de 50,50. Mostrando que el diluyente tres es el mejor de los tres para la crioconservación de semen en cuanto a la viabilidad.

Tabla 18

Prueba de Tukey al 5% de la variable viabilidad

Tratamiento	Medias	Rango de significancia
DT3	69,50	A
DT2	55,33	B
DT1	50,50	C

Los datos demuestran que el diluyente tres (D3) fue significativamente más eficaz para preservar la viabilidad espermática post descongelación que los otros dos diluyentes. Con un valor cercano al 70%, el D3 se ubica muy cerca del umbral de referencia aceptado para semen de buena calidad, que según (Crepaldi et al., 2024; Bustani y Baiee, 2021) debe superar el 65 al 70% para considerarse óptimo para uso reproductivo.

La alta viabilidad del D3 puede atribuirse a su contenido de Tris y yema de huevo, cuya fracción LDL lipoproteica protege la membrana espermática contra el daño estructural y oxidativo durante el proceso de congelación y descongelación (Abeyrathne et al., 2022; Mahiddine y Kim, 2021). Además, el Tris actúa como regulador del pH, minimizando el estrés osmótico intracelular.

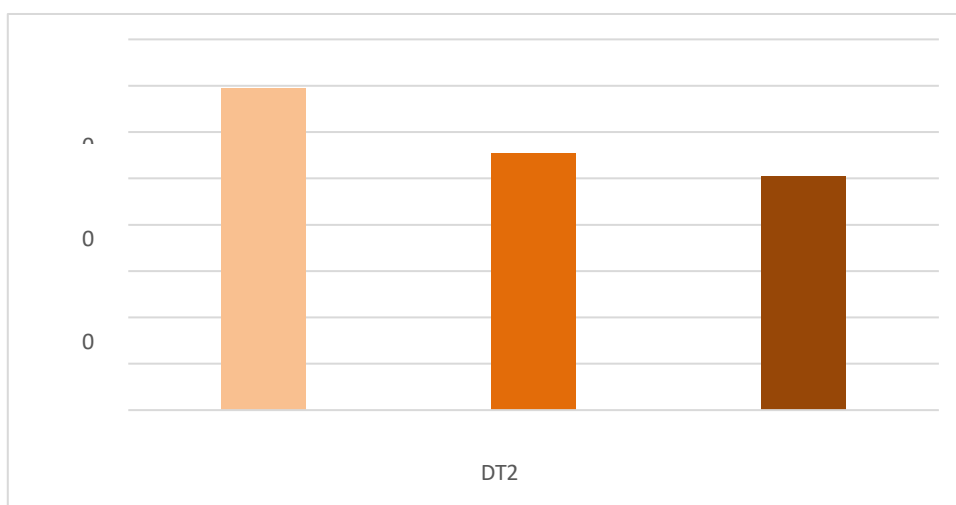
En contraste, D1 y D2 presentaron valores significativamente más bajos de viabilidad, siendo DT1 el de menor eficacia. Aunque ambos superan el umbral mínimo de 50% considerado funcional, su menor rendimiento podría reflejar la ausencia de componentes lipídicos activos o un equilibrio osmótico inadecuado, lo cual concuerda con lo reportado por (Nazeri et al., 2022; Schäfer-Somi et al., 2022).

Cabe destacar que, a diferencia de la motilidad o morfología, la viabilidad celular es altamente sensible al daño oxidativo acumulado durante el congelamiento. Por ello, la diferencia de casi 19 puntos porcentuales entre D3 y D1 (69.5% vs. 50.5%) tiene un impacto biológico relevante, especialmente en la fertilidad potencial del eyaculado (Mahiddine y Kim, 2021).

Aunque algunos estudios clásicos sugerían que la viabilidad espermática tras la descongelación debería superar el 70% en condiciones ideales, es crucial reconocer que la criopreservación en caninos muestra una alta variabilidad entre individuos. Estos cambios están influidos por factores como la composición del diluyente, las técnicas utilizadas y la calidad inicial del semen. Investigaciones recientes realizadas por (Crepaldi et al., 2024; Bustani y Baiee, 2021) coinciden en que alcanzar una viabilidad superior al 60-65% se considera clínicamente aceptable para propósitos reproductivos. En este contexto, los resultados obtenidos con el diluyente tres (D3), cercanos al 70%, pueden ser considerados adecuados y técnicamente eficientes para su uso en inseminación artificial. Se debe considerar que la criopreservación en caninos presenta una variabilidad inherente, como también señalan (Crepaldi et al., 2024) y (Bustani y Baiee, 2021). Por tanto, los valores obtenidos con DT3 pueden considerarse adecuados, especialmente en contexto clínico.

Figura 3.

Variable Viabilidad



CONCLUSIONES

- La evaluación de las características macroscópicas del semen canino reveló que el olor fue predominantemente neutro y el color osciló entre blanco transparente y blanco lechoso, correlacionándose con volúmenes eyaculados considerados normales. El volumen promedio de 8,18 ml se encuentra dentro de los rangos fisiológicos reportados para perros clínicamente sanos, lo cual respalda la calidad inicial de las muestras recolectadas.
- Respecto a las características microscópicas post dilución, los tres diluyentes utilizados lograron preservar niveles adecuados de motilidad masal ($\geq 70\%$), morfología normal ($>75\%$) y viabilidad ($>60\%$). No obstante, el diluyente tres (D3) destacó significativamente por sus valores superiores en todas las razas evaluadas, alcanzando una motilidad promedio de 80.8%, morfología del 84% y viabilidad del 74%, parámetros que se consideran óptimos para la crioconservación seminal según estándares actuales.
- Tras el proceso de congelación y descongelación, se evidenció una disminución esperada en todos los parámetros espermáticos, atribuible al estrés térmico y osmótico propio de la criopreservación. Aun así, el D3 conservó de forma significativamente mejor la calidad seminal, con una motilidad masal de 70.83%, morfología de 75.83% y viabilidad de 69.5%, cifras que fueron estadísticamente superiores ($p < 0.05$) en comparación con D1 y D2, conforme al análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey al 5%.
- A partir de estos resultados, se desarrolló y estandarizó un protocolo práctico de crioconservación de semen canino, considerando la disponibilidad de recursos y condiciones técnicas del contexto ecuatoriano. El diluyente tres (D3) fue determinado como el más eficiente para preservar la calidad espermática en caninos de razas pequeñas, medianas y grandes,

lo que lo convierte en la opción recomendada para futuras aplicaciones clínicas y reproductivas.

- La implementación de este protocolo constituye un avance relevante para la creación de un banco de germoplasma canino en la región centro del país, con el objetivo de promover la conservación de material genético de alto valor reproductivo, contribuir al manejo responsable de la reproducción y facilitar el acceso a biotecnologías reproductivas eficientes en el ámbito veterinario nacional.

RECOMENDACIONES

- Adoptar el protocolo estandarizado que se empleó como método principal el diluyente tres (D3) para la crioconservación de semen canino en clínicas veterinarias especializadas en reproducción asistida. Los resultados obtenidos en esta investigación apoyan su integración inmediata en los manuales de procedimientos clínicos, promoviendo así una técnica uniforme, efectiva y basada en evidencia para preservar semen con alto valor genético.
- Crear centros regionales de bancos de germoplasma en áreas estratégicas como Riobamba y sus alrededores, con el objetivo de mejorar la logística del transporte seminal, disminuir los costos operativos y asegurar un acceso rápido a las dosis crio conservadas. Esta centralización también jugará un papel crucial en la conservación de razas valiosas y el fortalecimiento de la diversidad genética a nivel nacional.
- Implementar programas de capacitación continua dirigidos al personal veterinario y técnico que participa en la gestión de protocolos de crioconservación y así fomentar la investigación comparativa de nuevos diluyentes o formulaciones comerciales en estudios futuros, evaluándolos rigurosamente frente al diluyente tres. Este enfoque posibilitará identificar alternativas potenciales con igual o mayor eficacia, tomando también en cuenta criterios como viabilidad económica, estabilidad técnica y disponibilidad tanto a nivel local como internacional.
- Asegurar que se cumplan las normativas sanitarias y legales en la crioconservación, garantizando que las clínicas estén autorizadas por Agrocalidad y posean los permisos necesarios para gestionar material genético. Se aconseja incorporar en el protocolo interno elementos de bioseguridad, trazabilidad y control de calidad acorde con la normativa nacional vigente. Esto proporciona validez legal al banco de germoplasma y refuerza su credibilidad frente a posibles alianzas institucionales o comerciales.

- Promover alianzas estratégicas entre universidades, centros de investigación y clínicas veterinarias privadas a nivel nacional con el objetivo de replicar y adaptar este estudio en diferentes contextos geográficos y bajo diversas condiciones ambientales. Esta colaboración será fundamental para fortalecer una red interconectada a nivel nacional dedicada a la criopreservación canina. Dicha red estará orientada hacia la conservación de la biodiversidad genética, mejora los programas de inseminación artificial, así como al avance continuo en medicina reproductiva veterinaria en Ecuador.

BIBLIOGRAFÍA

- Abeyrathne, E., Nam, K.-C., Huang, X., & Ahn, D. (2022). Egg yolk lipids: separation, characterization, and utilization. *Food Science and Biotechnology*, 31(10), 1243 – 1256. <https://doi.org/10.3390/ani15040599>
- Arango Múnera, J., Castrillón Zuluaga, V., Correa Rendón, N., Suárez Delgado, M., & Carrillo-González, D. (2020). Criopreservación de semen canino (*Canis familiaris*) en pajilla francesa en el municipio de Medellín, Antioquia. *Revista Colombiana de Ciencia Animal (RECIA)*, 12(2), 187–194. <https://doi.org/10.24188/recia.v12.n1.2020.754>
- Banchi, P., Ali Hassan, H., El Khoury, R., Wydooghe, E., & Van Soom, A. (2023). A comparative study of canine epididymal sperm collection techniques and cryopreservation. *Frontiers in Veterinary Science*, 10(1181054). <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1181054>
- Bencharif, D., Belala, R., Mimoune, N., Le Couazer, D., & Farnia, H. (17 de Abril de 2025). ProAKAP4 concentration in fresh canine semen and its correlation with motility parameters. *Veterinary and Animal Science*, 28, 100455. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2025.100455>
- Bustani, G., & Baiee, F. (2021). Semen extenders: An evaluative overview of preservative mechanisms of semen and semen extenders. *Veterinary World*, 14(5), 1220–1233. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.1220-1233>
- Chang, F., Zhang, B., Liu, H., Fan, H., Xie, R., Li, J., . . . Ruan, C. (2025). Effect of Centrifuged Chicken Egg Yolk on the Cryopreservation of Boar Semen. *Animals*, 15(4), 599. <https://doi.org/10.3390/ani15040599>
- Crepaldi, M., Iacono, I., Grassi, M., & Veronesi, M. (2024). Reference values for computer-assisted semen analysis and manual seminal parameters in dogs: a retrospective study on 295 ejaculates. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 66(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/s13028-024-00767-5>

- Divar, M., Azari, M., Mogheiseh, A., & Ghahramani, S. (2022). Supplementation of melatonin to cooling and freezing extenders improves canine spermatozoa quality measures. *BMC Veterinary Research*, 18, 86. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03186-8>
- Esch, M. (2014). *Performance of CaniPlus Freeze Extender for Freezing Canine Semen*. Tiefenbach, Alemania: Minitüb GmbH. https://huvsearch.com/dpics/pdfs/2014-01-22-04-34-58_PerformanceofCaniPlusFreeze.pdf
- Flores, R. B., Angrimani, D. S., Brito, M. M., Batagello, C. F., Kawai, G. K., Nichi, M., & al., e. (15 de Julio de 2022). Frozen-Thawed Sperm Analysis of Benign Prostatic Hyperplasia Dogs Treated With Finasteride. *Frontiers in Veterinary Science*, 9(901943), 1-9. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fvets.2022.901943>
- Herrera Pullas, P. G. (Julio de 2021). *Evaluación de dos curvas de congelación programables para la criopreservación de semen canino*. Repositorio UCE: <https://www.dspace.uce.edu.ec/entities/publication/f8341035-bca4-46db-8c94-cf7a639682eb>
- Kamal, M., Alam, M., Islam, M., Gofur, M., & Kabir, A. (2022). Effects of tris (hydroxymethyl) aminomethane and egg yolk on the cryopreservation of buck semen. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 9(4), 676 – 683. <https://doi.org/http://doi.org/10.5455/javar.2022.i636>
- Lechner, D., Aurich, J., Spergser, J., & Aurich, C. (2023). *Theriogenology*, 208, 126 – 131. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.06.002>
- Lechner, D., Aurich, J., Spergser, J., & Aurich, C. (2023). Double semen collection at a 1-h interval in dogs decreases the bacterial contamination of canine ejaculates. *Theriogenology*, 208, 126 – 131. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.06.002>
- Mahiddine, F. Y., & Kim, M.-J. (2021). Overview on the Antioxidants, Egg Yolk Alternatives, and Mesenchymal Stem Cells and Derivatives Used in Canine Sperm Cryopreservation. *Animals*, 11(7), 1930. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ani11071930>

- Martínez Barbitta, M., & Rivera Salinas, C. (2022). Evaluation of Chilled Dog Semen Extended With Sperm Activator. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 764750. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fvets.2021.764750>
- Meynard Flores, C. M., & Torrez Calero, I. F. (Septiembre de 2022). *Manual de manejo, preservación y criopreservación del semen canino*. Universidad Nacional Agraria, Nicaragua: <https://cenida.una.edu.ni/Tesis/tnl53m614.pdf>
- Minitüb GmbH. (2014). *Triladyl® & Biladyl® — Media for Bovine Semen Freezing*. Tiefenbach, Alemania: Minitüb GmbH. <https://www.scribd.com/document/658533832/13500-0004-BiladylTriladyl-es-120814>
- Minitüb GmbH. (2024). *CaniPlus — Canine Semen Extenders*. Minitube. https://www.minitube.com/userdata/files/13700-xxxx_Leaflet_CaniPlus_240508_en.pdf
- Mitjana, O., Ausejo, R., Mendoza, N., Miguel, J., Tejedor, M., Garrido, A., & Falceto, M. (2022). Photoperiod and Melatonin Supplementation: Variable Effects on the Quality of Chilled Dog Semen. *Frontiers in Veterinary Science*, 9(956630). <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fvets.2022.956630>
- Montoya-Páez, J. D., Giraldo-León, M. F., & Duque-Cortés, J. E. (22 de 05 de 2020). Evaluación de tres concentraciones de yema de huevo en diluyentes para criopreservación de semen bovino. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 31(2). <https://doi.org/10.15381/rivep.v31i2.17818>
- Nazeri, E., Niasari-Naslaji, A., Ghasemzadeh Nava, H., & Panahi, F. (2022). The effect of varying concentrations of chicken plasma egg yolk and glycerol on the viability of canine sperm following short and long-term preservation. *Iranian Journal of Veterinary Research (Shiraz University)*, 24(1), 6-13. <https://doi.org/10.22099/IJVR.2022.43403.6339>
- Ogata, K., Takeuchi, A., Ashibe, S., Sugane, N., & Nagao, Y. (2025). Optimization of canine sperm cryopreservation by focusing on glycerol concentration and freezing rate.

Veterinary Research Communications, 49, 86.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.087312>

Ortiz-Rodriguez, J., Orosco, F., Vázquez-Semadeni, E., Ferrusola, C. O., & Peña, F. J. (2022). Evaluation of two commercial extenders for cryopreservation of canine semen and their effects on post-thaw semen quality. *Frontiers in Veterinary Science*, 9(954921), 1–12. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fvets.2022.954921>

Partyka, A., Kostrzewa-Susłow, E., Dymarska, M., Ligocka, Z., Smalec, B., Kalinin, J., . . . & Niżański, W. (27 de Junio de 2024). Flavone and 3-hydroxyflavone supplementation in cryopreservation medium protects canine sperm against apoptosis and lipid peroxidation. *Theriogenology*, 226, 319 - 327. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2024.06.025>

Puerto Belta, R. (30 de Junio de 2021). *Infertilidad del macho canino*. Zaguán Unizar: <https://zaguan.unizar.es/record/106986/files/TAZ-TFG-2021-1606.pdf>

Ramón López, A. E., Fernández-Collahuazo, J. P., Samaniego, J. X., Duma, J. M., Méndez, M. S., Soria, M. E., . . . & Galarza, D. A. (2024). L-carnitine supplementation in conventional slow and ultra-rapid freezing media improves motility, membrane integrity, and fertilizing ability of dog epididymal sperm. *Animal Reproduction Science*, 270(107580), 107510. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2024.107580>

Schäfer-Somi, S., Colombo, M., & Luvoni, G. (2022). Canine Spermatozoa: Predictability of Cryotolerance. *Animals*, 12(6), 733. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ani12060733>

ScienceDirect Topics. (2025). *Semen Extender*. ScienceDirect: <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/semen-extender>

Sharafi, M., Borghei-Rad, S. M., Hezavehei, M., Shahverdi, A., & Benson, J. (2022). Cryopreservation of Semen in Domestic Animals: A Review of Current Challenges,

- Applications, and Prospective Strategies. *Animals*, 12(22).
<https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ani12233271>
- Sharma, R., Agarwal, A., Mohanty, G., & du Plessis, S. S. (Abril de 2022). Reactive oxygen species and sperm DNA damage: Mechanisms and clinical implications. *Andrologia*, 54(4), e14379. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/and.14379>
- Sinagra, L., Polisca, A., Donato, G., Caspanello, T., Pettina, G., Pastore, S., . . . Zappone, V. (11 de Septiembre de 2024). Enhancing canine semen quality through a second centrifugation after 48 h of storage: a comparative study. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 66(1), 1-12. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/rda.14200>
- Swelum, A. A., Ba-Awadh, H. A., Olarinre, I. O., Saadeldin, I. M., & Alowaimer, A. N. (12 de oCTUBRE de 2022). Effects of adding mixed chicken and quail egg yolks to the cryodiluent on the quality of ram semen before and after cryopreservation. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 1013533. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1013533>
- Usuga, A., Tejera, I., Gómez, J., Restrepo, O., Rojano, B., & Restrepo, G. (01 de Agosto de 2021). Cryoprotective Effects of Ergothioneine and Isoespintanol on Canine Semen. *Journal of Reproduction and Development*, 11(10).
<https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ani11102757>
- World Veterinary Journal. (2022). Comparative Analysis of One-step and Two-step Dilution on Quality of Frozen Semen in Kintamani Dogs. *World Veterinary Journal*, 12(3), 284–289. <https://doi.org/https://dx.doi.org/10.54203/scil.2022.wvj35>

ANEXOS

Marco Legal

Norma / Instrumento Legal	Ámbito	Contenido relevante para crioconservación de semen canino	Entidad responsable	Referencia
Código Orgánico de la Salud (COS)	Salud humana (aplicable indirectamente a veterinaria)	Establece lineamientos generales de control sanitario, bioseguridad y manejo de laboratorios que pueden aplicarse a insumos veterinarios y material genético animal. Exige altos estándares de higiene en clínicas veterinarias, similar a establecimientos de salud.	Ministerio de Salud Pública	Asamblea Nacional del Ecuador, 2020
Ley Orgánica de Sanidad Agropecuaria (LOSA)	Sanidad agropecuaria y reproducción animal	Regula calidad y origen del material genético, certificación zoonosanitaria, controles sanitarios, cuarentenas, trazabilidad, supervisión veterinaria y requisitos de infraestructura. Prohíbe circulación sin autorización.	AGROCALIDAD	Asamblea Nacional del Ecuador, 2017
Reglamento para Centros de Material Reproductivo (Res. DAJ-2021-0235)	Operación de centros reproductivos	Define tipos de centros, requisitos para permiso zoonosanitario, medidas de bioseguridad, bienestar animal, trazabilidad y alineación con estándares internacionales (ICAR, IETS).	AGROCALIDAD	Asamblea Nacional del Ecuador, 2017

Código Orgánico del Ambiente (COA)	Bienestar animal y fauna urbana	Regula la reproducción comercial de mascotas para evitar sobrepoblación; GAD municipales llevan registros y controlan criaderos. Fomenta esterilización responsable.	la de municipales	Ministerio del Ambiente y GAD	Asamblea Nacional del Ecuador, 2018
Ordenanza N° 004-2019 (Riobamba)	Gestión local de fauna urbana	Regula la reproducción y comercialización de mascotas; exige Registro Municipal y Permiso Sanitario para veterinarias y criaderos; prioriza control reproductivo y esterilización.	la y de	GAD Municipal de Riobamba	GADMR, 2019
Estándares de la OIE (OMSA)	Sanidad animal internacional	Código Sanitario para Animales Terrestres y Manual de Diagnósticos: requisitos sanitarios y certificaciones para comercio internacional de semen y embriones.		OMSA (antes OIE)	OMSA, 2023
Directrices IETS e ICAR	Estándares técnicos	Protocolos para criopreservación, evaluación de calidad, identificación y registro de material genético.		IETS / ICAR	IETS, 2024; ICAR, 2022
Principios bioéticos internacionales (3Rs)	Ética en uso de animales	Reemplazo, Reducción y Refinamiento en investigación y reproducción: uso eficiente y humanitario de animales y su material genético.		NC3Rs	NC3Rs, 2023

Protocolo propuesto

Fases	Procedimiento	Observaciones
1. Selección y examen de machos	Se seleccionan machos caninos entre 18 meses y 6 años, clínicamente sanos y con carácter reproductivo comprobado. Se realiza examen físico general como constantes fisiológicas, condición corporal ideal 3 de 5, revisión del pene para descartar lesiones y pruebas complementarias como hemograma, coproparasitológico y descarte de <i>Brucella canis</i> .	Priorizar animales mansos y de fácil manejo. Mantener registro completo y actualizado.
2. Recolección de semen	El procedimiento se realiza en un área interior limpia, utilizando tapete antideslizante. Se estimula al macho con hembra en celo o feromonas sintéticas, previa limpieza del prepucio con gasa estéril humedecida. Se recolecta exclusivamente la fracción espermática en recipiente estéril precalentado a 37 °C, evitando contaminación y contacto con las paredes del tubo.	Mantener el semen canino a 37 °C en baño térmico hasta su evaluación. No incluir fracción preeyaculatoria ni prostática, salvo en casos de concentración excesiva del semen canino.
3. Evaluación seminal macroscópica	Inmediatamente después de la recolección, se evalúa macroscópicamente (color blanco lechoso, volumen de 0.5–3 ml, viscosidad moderada, olor característico) y microscópicamente (motilidad masal a 100×, motilidad progresiva a 400×, viabilidad con eosina–nigrosina, morfología con tinción de Wright y concentración mediante cámara de Neubauer).	Solo se aceptan muestras con motilidad progresiva $\geq 70\%$, viabilidad $\geq 80\%$ y $\leq 15\%$ de anomalías.
4. Dilución	El semen se mezcla con el diluyente a 37 °C antes de mezclarlos. Se utiliza el Diluyente 3: Tris (2.42 g), ácido cítrico monohidratado (1.34 g), fructosa (1 g), agua destilada, glicerol, antibióticos (penicilina,	La temperatura no debe ser menor a 37 °C durante la dilución.

	tilosina, espectinomicina, lincomicina, gentamicina), DHS, yema de huevo al 20% y azúcar (0.5%). La dilución es en proporción 1:1, añadiendo el diluyente gradualmente mientras se agita suavemente. La mezcla se estabiliza en baño térmico durante 5–10 minutos.	
5. Carga y sellado de pajuelas	Se utilizan pajuelas de 0.25 o 0.5 ml, que se llenan con la muestra y utilizando jeringas estériles. Posteriormente se sellan con ácido poliglicólico, retirando 0.5 cm de muestra antes del sellado, y se identifican con nombre del macho, fecha y número de muestra.	Etiquetar de manera legible y que se mantenga incluso tras la inmersión en nitrógeno.
6. Refrigeración	Las pajuelas se colocan en una rejilla metálica en refrigeración controlada, reduciendo la temperatura hasta 4 °C en 2 horas, protegidas de la luz y sin agitación.	Evitar movimientos bruscos durante el enfriamiento. Comprobar temperatura interna del refrigerador con un termómetro externo digital.
7. Congelación	Se coloca la rejilla a 10 cm sobre vapores de nitrógeno líquido durante 10–12 minutos para un preenfriamiento controlado. Después, se sumergen completamente en nitrógeno líquido a –196 °C para su almacenamiento definitivo.	Manipular con pinzas que resistan el frío. Mantener las pajuelas sumergidas en todo momento durante el almacenamiento.
8. Descongelación	Aquí se prepara un baño María a 37 °C con agua estéril. Usando pinzas, se retiran las pajuelas del nitrógeno y se sumergen 50 a 60 segundos. Luego se secan con toalla estéril, se cortan los extremos y el contenido se transfiere a microtubo precalentado a 37 °C para evaluación inmediata.	No exceder el tiempo de descongelación. Procesar y evaluar inmediatamente tras extraer del baño María.
9.Recomendaciones generales	Todo el procedimiento se realiza en un área exclusiva para recolección y congelación, con higiene estricta.	Desechar material contaminado por bioseguridad.

Formato de ficha de recolección de datos.

1. Identificación del Canino

Nombre _____ **Jasper** _____

Raza _____ Gran Danes _____

Edad (años) _____ 3 años _____

Tamaño corporal Pequeño Mediano Grande

Peso (kg) _____ 53 kg _____

2. Datos Reproductivos

Historial reproductivo Sí ha reproducido No ha reproducido

Libido Alta Media Baja

Frecuencia de montas previas _____ 2 montas previas probadas _____

3. Datos de la Muestra Seminal

Fecha de recolección _____ 26 / 12 / 2024 _____

Volumen total (ml) _____ 20 ml _____

Color _____ Blanco Transparente _____

Olor Neutro Fétido Otro:

Motilidad masal (0-5) _____ 74% _____

Motilidad individual (%) ___ Buena _____

Viabilidad espermática (%) ___ 78 _____

**Morfología espermática (%
normales)** ___ 80 _____

Concentración (millones/ml) ___ 860 _____

Pedigrís de los caninos evaluados.

1. Pedigree del canino "Odín "

Documento proporcionado por el criador (2025)

Raza: DEUTSCHER SPITZ / SPITZ ALEMÁN (ZWERGSPITZ / ENANO / POMERANIAN) YZIBJBC: NU
 Fecha de Nacimiento: ECUADOR Mayo 10, 2021 Color: ORANGE
 Criador: JESSICA LORENA CARRERA BAYAS Proprietario: MARYAN TAWAYO DIAZ

Padres (I)
 GARGANTUA HUGO RKF 5945542
 LER 29114 ORANGE SABLE



Abuelos (II)
 SHAMA NI STAR CHIR-KIN-LIN RKF 5030966 CREAM
 SKAZKA VICTORII ZULEIYA RKF 4677720 ORANGE
 ALTOZ HAUZ ZHAK BATIST MAY HEYB RKF 4734655 WHITE

Bisabuelos (III)
 JUAN JOSE NEL RKF 4381725
 SHAMA NI STAR CHERESHNYA V SHOKOLAD RKF 3973740
 DAN STAR-KCH KARDES FULL MONTI RKF 4069843
 GLORIA RKF 3586065
 ROSHY HARD DRIVE RKF 3520240
 ALTOZ HAUZ CRCH-DEA CREAM RKF 4121849
 DELISHES ADRENULIN BOTASH RKF 3330065
 ALBINA CHER-NAYA ROZA RKF 3503392

Tatarabuelos (IV)
 SNOW DREAM OF LIN CHI TIEN RKF 3625468
 FLORETTA FANDI RKF 3817025
 ZAY CHIK DUMA KINSHIT RKF 3221350
 SHAMA NI STAR KURIA IMPERATORA RKF 3502883
 CH ROS AF ILELISR UNR. SILKOUTTES SO SFECAL N DRG RKF 242773
 TS3224152
 CH ROL. DAN STAR-KOM HAPPY DAN'S RKF 2909961
 AFONYA D. GRIGORE NI RKF 3167866
 YUVE LRNDE UKRASIE NE DUEIMA RKF 3167866
 SNOW DREAM OF LIN CHI TIEN RKF 3624408
 ROSHY SHELL BE SHDY RKF 3146225
 TENDY OF LIN CHI TIEN RKF 2811824
 ALMA-NAYA KRISMA YASOOKA V SARASE RKF 2818823
 CAIUS IUSUS DEL JES DUCK POT RKF 2778263
 DALRU. ILLUSHIES GUAMBA CHINE NAKTA RKF 2779456
 CHRUS BR. JAN SHASS HDE AND SEED RKF 2519873
 TS4339303
 PANDOKHA DZ USABY ANDREY YOH RKF 2519873

Madre:
 OLMIKS LINE DZHIKTA RKF 3465565
 LER 29101 ORANGE

REGISTRO DE REPRODUCTORES DE EQUINOS DEL ECUADOR

Ejemplar canino de raza pequeña “Odín “



2. Pedigree del canino "Cooper"

Documento proporcionado por el criador (2025)

ASOCIACION ECUATORIANA DE REGISTROS DE REGISTROS CANINOS
MIEMBRO DE LA FCI, SICALAM, Y RECONOCIDA POR LA AKC

Nombre del Perro: FLOPY HAKIM KENNEL
Raza: SHIH TZU
Fecha de Nacimiento: ECUADOR Agosto 25, 2017
Criador: DANILO MARCELO GUEVARA CARRERA

LIBRO ECUATORIANO DE REGISTROS CERTIFICADO DE REGISTRO GENEALOGICO
P E D I G R E E

Registro: LER 25553
Microchip: 900118000361379
Criador: HAKIM KENNEL

Sexo: MACHO
Variedad: ND
Color: TRICOLOR
Propietario: DANILO MARCELO GUEVARA CARRERA

Padres (I)

Padre:
CH CEC. ALPHA VOM MARCOS HAUS
LER 16953
TRICOLOR

Abuelos (II)

GRCH EC. CH.L. YO-YO-MA-DE MIRAMONTES
LER 729922944 LOC. 42919
DORADO Y BLANCO

YULY
LER 10347
DORADO BLANCO Y NEGRO

CHECL. POMPON DEL MUMASQUI
LER 14518 FCA/8566
TRICOLOR

LINTAO
LER 13458
ROJO /BLANCO

Bisabuelos (III)

CH CO. WEINRICK'S WRAPPED WITH LOVE
LOC. 34605

CH CO. KAN-SU-DE MIRAMONTES
LOC. 33177

GRCH EC. CH.L. ABRACADABRA SHELTER BLUE
KCP-RD-1651601

CHECL. NANNY
LER 7124

ABU SIMBEL LUDOVICO BROWN
FCA/8295

ABU SIMBEL FEDRA BROWN
FCA/6568

CHEC LINJUTAN
LER 4891

CHECL NANNY
LER 7124

Tatarabuelos (IV)

CH WEINRICK'S WRAPPED IN A RAINBOW
TND18719
WEINRICK'S VS LUCY SYMMETRICK
LW671944

CH CO ELI WAH-JONCS BATTERY OPERATED
LOC. 31586
CH CO. TIALINS TINY TINA
LOC. 23893

ANDY SHELTER BLUE
KCP-RD1651699
FASHION GIRL SHELTER BLUE
KCP-RD-1651201

PANCHO
TND82560
BONNIE XX
TND1466006

ELIBRUITOS ADEL BROWN
FCA/9791
GUL BOOTS LADY BUBBLE
FCA/6572

ELIBRUITOS ADEL BROWN
FCA/8756
GUL BOOTS LADY BUBBLE
FCA/6572

CHEC COLK. VAC. LY YUAN-CE MIRAMONTES
LOC. 38919
TIANUN NANTALE
TNS72808

PANCHO
TND825603
BONNIE XX
TND1466006



www.aecan.com



Madre:
NELLIE VOM MARCOS HAUS
LER 17281
TRICOLOR



Ejemplar canino de raza pequeña “Cooper “




3. Pedigree del canino "Max"

Documento proporcionado por el criador (2025)

AMERICAN KENNEL CLUB • FOUNDED 1884

Certified Pedigree



LER 21131

ICE RUILOVA'S BULLDOG
 NP34824905
 BULLDOG MALE WH
 Date Whelped: 04/21/2013
 Breeder: MAURICIO DAVID RULLOVA

Sire IT'S DREAM TEAM BULL SNOW CRONOS
 NP29303501 (03-13) RD BRDL & WH

Dam REMBOMBORY EVANGELINE RUILOVA
 NP31094605 (10-13) WH SPTD

GCH CH CHEROKEE ORIGIN SNOW LION
 NP23438504 (02-11) WH AKC DNA #V641542

GCH CH HETHERBULL TOPLINE O-O
 NP20620502 (09-09) RD BRDL & WH AKC
 DNA #V570725

CHEROCHEE LEGEND MONEYPENNY
 NP18354302 (10-09) RD & WH

CH LYERLY'S SPELLBINDER
 NP12463701 (09-07) RD BRDL & WH AKC
 DNA #V487652

CH SHOWTIME HELLO DOLLY
 NP02354303 (10-04) RD BRDL & WH WH
 MKGS

SAN SIMON BULLS GASTON
 LOE 1650827

REMBOMBORY MADONNA
 LOE 1585660

CH CHEROKEE LEGEND ROCK
 NP08424501 (02-06) RD BRDL & WH AKC
 DNA #V281343

SAKIRA ANTHONY S BEBE
 NP13700210 (07-08) RD & WH


LYERLY'S IT'S DREAM TEAM
 NP22421402 (10-11) RD BRDL & WH

REMBOMBORY TRICHET
 LOE 1772298 (06-12)

FANCY CHEROKEE DREAM CATCHER JAYME
 NP21195602 (08-10) BRDL & WH

Jane L. Sewley
 Executive Secretary

The Seal of The American Kennel Club affixed hereto certifies that this pedigree was compiled from official Stud Book records on August 9, 2013.



AMERICAN KENNEL CLUB®

Ejemplar canino de raza mediano “Max “



Ejemplar canino de raza mediano “Kai “



5. Pedigree del canino” Jasper “

Documento proporcionado por el criador (2025)

FEDERACION CANOFILA MEXICANA, A.C.		Afilada a la Federation Cynologique Internationale (FCI) Thuin, Belgique		No. DE REGISTRO	
No. DE MICROCHIP		Pedigree Genético de Exportación / Export Genetic Pedigree		FCMC9786-C	
CERTIFICADO INTERNACIONAL DE PEDIGREE					
TITULOS NOMBRE DEL EJEMPLAR RAZA O VARIEDAD COLOR TALLA SEXO FECHA Y LUGAR DE NACIMIENTO No. DE REGISTRO DE FCM OBSERVACIONES DNA CERTIFICACION		CREADOR PROPIETARIO(S) COPROPIETARIO COPROPIETARIO DIRECCION COLONIA CIUDAD TELEFONO / e-mail		JORGE GARDUÑO CALZADA ALEX ARTURO VILLAFUERTE GAVILANEZ VELOZ 3720 Y IRASIL RIORAMBA CHIMBORAZO ECUADOR C.P. 593-8-776-2444 dral@evolat.net/foctomai.com	
MOHAMED (GARDUÑO) MEX. FCI GRAN DANÉS NEGRO MACHO 05/06/2024 EDO. DE MEXICO FCMC9786-C SETAUO		XERALT JR GREAT DANE AGUIRRE MEX.FCI ARLEQUIN GR 5363NA 93000002126149		SPIDER CLAUDIA BOHEMICA CERNA, HILÉ 2NARY TALLA REG. NUM. MICROCHIP DNA CERTIFICACION GC-3511 - CAN/LND/2169415 90001270; 8120-4	
SAV ASCI GREAT DANE MEX.FCI NEGRO BUNCA 9300000217141		ZHARA GREAT DANE AGUIRRE MEX.FCI BOSTON GR 2665-B 93000002499083		HDJ CAMEX CAMP MEX DNO 13468 CAROLA GREAT DANE AGUIRRE MEX.FCI ARLEQUIN CC-0386-C 93000002442647 LDCFI76878/A	
EREK DE BRANDIS BLANCO Y NEGRO FCMK861 / LOE 2168703 941000019741169		AMORODO DE URCORA MANTLE GB-441 / LOE 3098037 94100001408884		ZHARA GREAT DANE AGUIRRE MEX.FCI BOSTON GB-R534-C 93000002197034	
MILA (GARCIA) MEX.FCI NEGRO FI 8117468-2 93000002504787		LUZADOR EMANUEL BLU KANTO TALLA REG. NUM. MICROCHIP DNA CERTIFICACION LOE 314535 / RNF 3141307		CHUELETH JAGGER DE EL CAMILNER TALLA REG. NUM. MICROCHIP DNA CERTIFICACION LOE 2043513	
ARETIA (MENDOZA) MEX.FCI BOSTON FCM1299-B 93000001399216		KLEIN VON SCHULEN Schwarz TALLA REG. NUM. MICROCHIP DNA CERTIFICACION FCM14740 / KN DD AQ8759 9430000148244		ZOE GREAT DANE AGUIRRE MEX.FCI NEGRO TALLA REG. NUM. MICROCHIP DNA CERTIFICACION GB-3581-D	
FEDERACION CANOFILA MEXICANA A.C.		FCI		SUPERIOR MARCA CERTIFICADA	
				FECHA DE EMISION Olaf Maldonado 24/11/2025	

Ejemplar canino de raza grande “Jasper”



6. Pedigree del canino” Arthur “

Documento proporcionado por el criador (2025)

AMERICAN KENNEL CLUB	
NAME CHUKI DE YURAK URKU ALLKUKUNA	NUMBER WS84732105
BREED ROTTWEILER	SEX MALE
COLOR BLACK & TAN	DATE OF BIRTH JULY 1, 2024
SIRE ARTHUR YURAK URKU ALLKUKUNA WS80828501 12-24	 AMERICAN KENNEL CLUB®
DAM EMILIA YURAK ROTT CASA D CASTILLO WS84449501 12-24 (AKC DNA V10138010) (ECU)	
BREEDER DR. ALEX ARTURO VILLAFUERTE & IVAN REINALDO CASTILLO GUEVARA	CERTIFICATE ISSUED OCTOBER 9, 2024
OWNER DR. ALEX ARTURO VILLAFUERTE & IVAN REINALDO CASTILLO GUEVARA 353 LONGWOOD AVE BOUND BROOK NJ 08805-1607	<small>This certificate invalidates all previous certificates issued. If a date appears after the name and number of the sire and dam, it indicates the issue of the Stud Book Register in which the sire or dam is published. For Transfer Instructions, see back of Certificate. This Certificate issued with the right to correct or revoke by the American Kennel Club.</small>
REGISTRATION CERTIFICATE	

Ejemplar canino de raza grande “Arthur “

