



UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE CUENCA

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS

AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

RELACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS CORPORALES

Y MORFOMETRÍA TESTICULAR EN LA

CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES

EPIDIDIMARIOS CANINOS

TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL

TÍTULO DE MEDICO VETERINARIO

AUTOR: IVANA SOFIA VERDUGO MORALES

DANIELA ESTEFANIA VILLACIS CABRERA

DIRECTOR: DRA. DINA MARICELA VELOZ VELOZ MSC

CUENCA – ECUADOR

2023

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS

AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

**RELACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS CORPORALES Y
MORFOMETRÍA TESTICULAR EN LA CRIOPRESERVACIÓN
DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMARIOS CANINOS**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE MEDICO VETERINARIO**

AUTOR: IVANA SOFIA VERDUGO MORALES

DANIELA ESTEFANIA VILLACIS CABRERA

DIRECTOR: DRA. DINA MARICELA VELOZ VELOZ MSC

CUENCA – ECUADOR

2023

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO

Declaratoria de Autoría y Responsabilidad

Ivana Sofia Verdugo Morales portador(a) de la cédula de ciudadanía N° **1729159523** y **Daniela Estefania Villacis Cabrera** portador(a) de la cédula de ciudadanía N° **0105744981**. Declaramos ser las autoras de la obra: **“RELACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS CORPORALES Y MORFOMETRÍA TESTICULAR EN LA CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMARIOS CANINOS”**, sobre la cual nos hacemos responsables sobre las opiniones, versiones e ideas expresadas. Declaramos que la misma ha sido elaborada respetando los derechos de propiedad intelectual de terceros y eximo a la Universidad Católica de Cuenca sobre cualquier reclamación que pudiera existir al respecto. Declaramos finalmente que nuestra obra ha sido realizada cumpliendo con todos los requisitos legales, éticos y bioéticos de investigación, que la misma no incumple con la normativa nacional e internacional en el área específica de investigación, sobre la que también nos responsabilizamos y eximo a la Universidad Católica de Cuenca de toda reclamación al respecto.

Cuenca, **5 de Mayo de 2023**



Ivana Sofia Verdugo Morales



Daniela Estefania Villacis Cabrera

C.I. 1729159523

C.I. 0105744981

CERTIFICACIÓN

Yo Dina Maricela Veloz Veloz, con cedula de identidad N° 1720299302 en calidad de Directora del Trabajo de Titulación con el tema: “RELACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS CORPORALES Y MORFOMETRÍA TESTICULAR EN LA CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMARIOS CANINOS”, certifico que el presente trabajo fue desarrollado por IVANA SOFÍA VERDUGO MORALES y DANIELA ESTEFANÍA VILLACIS CABRERA, bajo mi supervisión.



Msc. Dina Maricela Veloz Veloz

DIRECTO

DEDICATORIA

Dedicamos esta tesis a nuestros padres, por todo su apoyo y motivación para seguir adelante.

Gracias por su amor y sacrificio; pero, por encima de todo, por enseñarnos a nunca rendirnos ante las barreras de la vida.

Este logro es también suyo.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a nuestros docentes el Ingeniero Manuel Maldonado y Doctor Daniel Argudo por habernos acompañado a lo largo de la preparación de nuestro trabajo de investigación; y de manera especial a la Doctora Dina Veloz tutora de nuestro proyecto de investigación quien nos ha guiado con su conocimiento, paciencia y rectitud como docente.

También queremos agradecer a nuestros profesores quienes nos han aportado conocimiento a lo largo de nuestra travesía de estudio, los cuales nos han guiado para poder realizar nuestra tesis final.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Contenido

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
I. CAPÍTULO	3
1. INTRODUCCIÓN.....	3
OBJETIVOS	5
<i>Objetivo General</i>	5
<i>Objetivos Específicos</i>	5
HIPÓTESIS	5
II. CAPÍTULO	6
2. MARCO TEÓRICO.....	6
<i>2.1. Anatomía reproductiva del perro</i>	6
<i>2.1.1. Testículo</i>	6
<i>2.1.2. Cordón espermático</i>	6
<i>2.1.3 Epidídimo</i>	6
<i>2.1.4. Mediciones testiculares</i>	7
<i>2.2 Fisiología espermática.</i>	9
<i>2.3. Gametogénesis en el perro</i>	10
<i>2.3.1. Espermatogénesis</i>	10

2.3.2. Espermatoцитогénesis	10
2.3.3. Espermioгénesis	13
2.3.4. Espermiaсión	13
2.3.5. Morfología del espermatozoide	14
2.4. Características del semen canino	15
2.5. Obtención de espermatozoides caninos de la cola del epidídimo	16
2.6. Principios biofísicos de la crioconservación.	17
2.6.1. Efecto de la temperatura y osmolaridad en el ambiente celular. 17	
2.6.2. Criopreservación	18
2.7. Congelación de espermatozoides epididimarios caninos.	19
2.7.1. Criopreservación de espermatozoides del perro	19
2.7.2. Efecto de diluyentes y crioprotectores sobre el ambiente celular. 20	
2.7.3. Envasado	22
2.7.4. Descongelación	22
2.8. Análisis microscópico post congelación	23
2.8.1. Evaluación de la motilidad individual progresiva	23
2.8.2. Determinación de la morfología y vitalidad espermática	24
2.8.3. Test de HOST	24
2.8.4. Integridad de la membrana plasmática (Ioduro de propidio).	25
III. CAPÍTULO	27

3. MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1. Tipo de Estudio	27
3.2. Ubicación del ensayo	27
3.3. Materiales	28
3.4. Metodología	29
3.4.1. Toma de datos y recolección de muestras.	29
3.4.2. Análisis morfométrico y extracción de espermatozoides.	30
3.4.3. Congelación de esperma.	31
3.4.4. Descongelación y evaluación de los espermatozoides	32
3.4.4.1 Características microscópicas	32
3.4.7. Diseño experimental	35
3.4.7.1. Variables de inclusion.	35
3.4.7.4. Variables dependientes del experimento	36
3.4.7.6. Análisis estadístico	36
IV. CAPÍTULO	37
4. RESULTADOS	37
V. CAPÍTULO	43
5. DISCUSIÓN	43
VI. CAPÍTULO	46
6. CONCLUSIONES	46

VII. RECOMENDACIONES	47
VIII. BIBLIOGRAFÍA	48
IX. ANEXOS	63

RESUMEN

La finalidad del presente estudio fue determinar la relación entre las características corporales y morfometría testicular, con las características cualitativas y cinéticas de los espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo del perro, después de la orquiectomía antes y después de la criopreservación. Las muestras testiculares fueron obtenidas de 26 perros, de diferentes edades. Los testículos fueron colocados en solución salina (0.9%) y refrigeradas durante 24 horas para posterior congelación. Los espermatozoides fueron recuperados con la técnica de flujo retrogrado y dilución Tris+yema de huevo. Para su criopreservación se le añadió glicerol al 5%, como crioprotector. La muestra fue envasada en pajillas de 0,5ml, y fueron sometidas a una curva de enfriamiento durante dos horas a 5°C para luego ser colocadas sobre vapores de nitrógeno líquido durante 15 minutos, para luego ser sumergidas directamente. Los parámetros que se evaluaron fueron: Motilidad individual progresiva, integridad de la membrana plasmática, vitalidad y morfoanomalías de la membrana e integridad del acrosoma antes y después de la congelación. En adición, se obtuvieron datos de concentración únicamente previo a la congelación. Los parámetros se vieron drásticamente afectados tras la congelación, concluyéndose que existen factores externos y de manejo de las muestras que pueden afectar la calidad espermática del semen de epidídimo de perros, dado que existen relaciones más positivas obtenidas en este estudio que indican que la calidad espermática es cualitativamente mayor en animales medianos sobre pequeños y grandes, por lo que es necesario identificar estos factores en futuras investigaciones.

Palabras clave: Testículos, criopreservación, perros, morfometría testicular.

ABSTRACT

This study aimed to determine the relationship between body characteristics and testicular morphometry with the qualitative and kinetic components of sperm obtained from the epididymis tail of dogs before and after cryopreservation following orchiectomy. Testicular samples were obtained from 26 dogs of different ages. The testes were placed in saline solution (0.9%) and refrigerated for 24 hours before freezing. Spermatozoa were recovered by retrograde flow technique and Tris-egg yolk dilution. Glycerol at 5% was added as a cryoprotectant for cryopreservation. The sample was packed in 0.5 ml straws and subjected to a cooling curve for two hours at 5 °C, then placed over liquid nitrogen vapors for 15 minutes and subsequently immersed directly. The parameters evaluated were: progressive individual motility, plasma membrane integrity, vitality, and membrane and acrosome morpho-anomalies before and after freezing. Additionally, concentration data were obtained prior to freezing. The parameters were drastically affected after freezing, leading to the conclusion that external factors and sample handling can affect the sperm quality of epididymal semen in dogs. This study found more positive relationships, indicating that sperm quality is qualitatively higher in medium-sized animals compared to small and large ones. Therefore, it is necessary to identify these factors in future research.

Keywords: testes, cryopreservation, dogs, testicular morphometry

I. CAPÍTULO

1. INTRODUCCIÓN

La criopreservación ha trascendido con gran aceptación en implementación de biotecnología de empleo reproductivo, logrando condiciones óptimas para la preservación integral del germoplasma masculino de animales que poseen un alto valor genético; sin embargo, se describen variaciones de acuerdo a la especie (Pesch et al., 2007).

Esta técnica resulta de gran valor al facilitar la aplicación de técnicas asistidas; los espermatozoides epididimarios, así como el eyaculado, poseen la factibilidad en uso de tecnologías de como la inseminación artificial convencional a tiempo fijo (IACRF), fertilización in vitro (FIV), como también en inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) (Peres et al., 2014).

El avance de la inseminación artificial en base al uso de gametos criopreservados ha guiado cambios de importancia trascendental en la industria pecuaria. El semen congelado es utilizado sustancialmente a nivel mundial en programas que buscan un mejoramiento animal. Si bien su estudio se ha vuelto de uso rutinario en animales de producción como los bovinos, no ocurre lo mismo con el canino, resaltándose en pleno desarrollo (Robles et al., 2005).

El incremento de atención hacia la preservación del material genético en animales se reporta desde la criopreservación exitosa de embriones en la especie murina en 1972, donde se usó una tasa de congelación de 0,3 a 2,0°C/min con una tasa lenta de descongelación de 4 a 25°C/min (Whittingham et al., 1972).

La obtención de espermatozoides del epidídimo se considera la última oportunidad para usar los gametos de reproductores en condiciones adversas. En este caso, diversos eventos inesperados tales como intoxicaciones, enfermedades o accidentes, pueden súbitamente obligar una orquiectomía. Sin embargo, resulta de sumo interés reconocer que ciertos aspectos y características del canino presidirán un mejor almacenamiento espermático (Santos et al., 2015).

El almacenamiento de tiempo indefinido del semen canino se conduce con los utilizados habitualmente en diferidas especies de animales, con el uso de nitrógeno líquido (LN2), describiendo tasas de preñez de hasta un 60% (Lara et al., 2019).

Desde entonces se ha venido generando diversos experimentos en diversas especies, tal es el caso del canino, pero a día de hoy aún se describen cuestionables avances en esta especie. Con esta investigación se pretende fomentar nuevas investigaciones sobre la criopreservación del semen canino, con fines de implementación

explícitamente necesarios como la preservación de animales que fomentan áreas de rescate o ayudan en el servicio comunitario.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Relacionar las características corporales, edad y morfometría testicular en la criopreservación de espermatozoides epididimarios caninos.

Objetivos Específicos

- Correlacionar la edad y características corporales del perro a las características cualitativas y cinéticas de los espermatozoides epididimarios congelados/descongelados.
- Comparar las características cualitativas y cinéticas de los espermatozoides epididimarios post-congelación, los diferentes grupos etarios, condición corporal, peso y características corporales.
- Determinar la relación del peso, diámetro, largo y ancho del testículo y las características cualitativas y cinéticas de los espermatozoides epididimarios congelados/descongelados.

HIPÓTESIS

Las características corporales, la edad y morfometría testicular influye en las características cualitativas y cinéticas de los espermatozoides epididimarios congelados.

II. CAPÍTULO

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Anatomía reproductiva del perro

2.1.1. Testículo

Los testículos del canino son de tamaño pequeño, con forma elipsoidal y se encuentran albergados en el escroto (Feldman & Nelson, 2007). Conformados por túbulos seminíferos que se encargan de producir espermatozoides (Aguera, 2005). Es el principal órgano de reproducción del macho, su función es la de generar hormonas y desarrollar gametos masculinos, que se encuentran ausentes al nacimiento, en otras palabras, las células germinales masculinas pasan por una serie de divisiones durante la vida reproductiva del canino (Santana, 2007). Los testículos sobrepasan el canal inguinal en torno a los 10-14 días posteriores al nacimiento (Allen, 1998).

2.1.2. Cordón espermático

Presente entre la pared abdominal y el testículo, estructuralmente se forma del conducto deferente que brinda transporte desde el epidídimo hacia la uretra, el músculo cremáster que modifica la distancia de los testículos al abdomen, generando así termorregulación (Allen, 1998). La arteria espermática que conduce sangre desde la aorta hacia el testículo y la vena espermática que asegura el retorno de la sangre desde el testículo hacia la vena cava, garantizando la disminución de temperatura de la sangre arterial, por lo mismo, evita un calentamiento incrementado del testículo (Simpson, 2000).

2.1.3 Epidídimo

El epidídimo se localiza sobre el margen dorsal del testículo y craneodorsal a la cola del epidídimo (López, 2020). Es un conducto sinuoso, único y de gran longitud

dispuesto a lo largo del borde medial del testículo y está conformado por cabeza, cuerpo y cola. Cumple con funciones de almacenamiento, transporte de espermatozoides y maduración de espermatozoides; también contiene una reserva de espermatozoides (Klein, 2020).

- **Cabeza:** comprende las partes terminales de los conductos eferentes y el primer tracto del conducto epididimario.
- **Cuerpo:** medio de adherencia entre la cabeza con la cola.
- **Cola:** se dónde se almacenan los espermatozoides maduros, continua por el conducto deferente, el cual transporta el semen hacia la uretra durante el proceso de la eyaculación (Varesi et al., 2013).



Figura 1. Testículos del perro

Fuente: (Eilts, et al., 1993)

2.1.4. Mediciones testiculares

Los parámetros morfométricos de la circunferencia escrotal (CE), siendo poco estudiados en la especie canina, constituyen un referencial sumamente importante para la evaluación andrológica. La CE se describe como el tamaño testicular manifestado en

cm, y va en conexión con la cantidad de epitelio seminífero presente en el parénquima testicular.

Thompson et al., (1995) nos dice que la medición escrotal se ha recomendado como un test clínico para la evaluación de fertilidad potencial en toros jóvenes. Por lo tanto, la circunferencia escrotal se ha relacionado ventajosamente con la diaria producción de espermatozoides y el peso testicular. Junto con el porcentaje de espermatozoides vivos, motilidad espermática, número de espermatozoides y calidad de semen en bovinos.

Bailey et al., (1996), añade datos sobre una posible relación entre la morfometría testicular (largo y ancho) y la producción de semen. En el análisis nos muestra que un número amplio de autores han determinado una alta relación entre los valores de circunferencia escrotal, tamaño testicular y producción de semen en toros (Coulter et al., 1988.), carneros (Lino, 1972) y verracos (Cartee et al., 1989). Así mismo, pero no menos importante, la circunferencia escrotal es altamente heredable.

Olar et al., (1983) establece que el ancho total del escroto es positivamente útil como profetizador de la capacidad de los perros para producir y eyacular espermatozoides. Además, Woodall & Johnston, (1988) expone que aquellos perros que muestran un índice (calculado por el promedio del largo de ambos testículos y el epidídimo multiplicado por el ancho total del escroto) mayor a 18.00, poseen una función de espermatogénesis comparativamente aventajado que los perros que muestren valores del índice menores.

2.2 Fisiología espermática.

Los espermatozoides de los mamíferos se representan en tres procesos fisiológicos con el propósito que obtengan la capacidad fertilizante, estos son:

- **Maduración:** dentro del epidídimo se da la maduración morfológica y funcional de los espermatozoides, el desarrollo progresivo de la capacidad fecundante se da en la cabeza y en el cuerpo del epidídimo y en la cola se almacena (Greer, 2014).
- **Captación:** ocurre durante la progresión de los espermatozoides por la región caudal del istmo del oviducto, solo los espermatozoides que poseen un acrosoma reactivo podrán hacer la captación (Santana, 2007).
- **Reacción acrosomal:** una vez que el espermatozoide ha pasado por el proceso de captación, finalmente se da el proceso de reacción acrosomal, ocurre la cercanía o contacto con las cubiertas del ovocito y en espermatozoides de perros se ha observado que tanto los que han reaccionado como los no reaccionado, serían capaces de unirse a la zona pelúcida de ovocitos caninos (Rodrigues, 2009).

Según Santana, (2007), menciona que las medidas establecidas de los espermatozoides caninos, se dividen como valores medios (\pm) los siguientes: longitud total, $68 \pm 0.3 \mu\text{m}$; longitud de la cabeza, $7 \pm 0 \mu\text{m}$; ancho de la cabeza, $5 \pm 0.1 \mu\text{m}$; longitud de la cabeza intermedia, $11 \pm 0.2 \mu\text{m}$ y la longitud de la cola $50 \pm 0.3 \mu\text{m}$.

2.3. Gametogénesis en el perro

2.3.1. Espermatogénesis

Se conoce a la espermatogénesis como un conjunto de etapas secuenciadas, de proliferación celular y modificaciones citológicas que dan comienzo en las células diploides y dan termino con las células haploides (Aguera, 2005).

La gametogénesis tiene comienzo en el estadio fetal del perro, en el cual las células primordiales se distinguen en gonocitos que serán sometidos al proceso de mitosis; en su vida fetal como en la pubertad. En esta etapa se diferencian en espermatogonias, fase en la que se termina el desarrollo de las células germinales a la altura de los túbulos seminíferos, hasta entrada la pubertad (Simpson, 2000).

El desarrollo de los espermatozoides en los túbulos seminíferos empieza en un aproximado de 4 meses de edad y con duración de unas 8 semanas (McDonald, 1991), Hay que tomar en cuenta que, aunque el desarrollo de los primeros espermatozoides en el eyaculado no tiene definición sino hasta los 10-12 meses de edad. Sin embargo, otros autores afirman que el proceso de formación de las células de Leyding no culmina sino hasta los 6-7 meses de edad (Simpson, 2000).

Diversas estructuras que componen el testículo (saco escrotal, músculo dartos, músculo cremaster, vasos sanguíneos del cordón espermático) afianzan la temperatura adecuada para mantener el ciclo en proceso (Simpson, 2000).

2.3.2. Espermatocitogénesis

La primera fase de la espermatogénesis representa la producción recurrente de los espermaticitos primarios. Una proporción ajena a las células de división, representa una reserva de espermatogonias en latencia, persistente a las alteraciones por radiación,

toxinas o inclusive traumatismos (McDonald, 1991). Se conoce que, en la especie canina cada espermatogonia es apto para producir unos 64-96 espermatozoides.

Las espermatogonias (precursoras de los espermatozoides), se encuentran en la membrana basal de los túbulos seminíferos. Estos sufren un proceso de mitosis para el desarrollo de los espermatocitos primarios, los cuales, posteriormente, sufren una meiosis para el desarrollo de espermatocitos secundarios; concluyendo con la conversión en espermátidas esféricas que poseen ya la mitad de cromosomas (Simpson, 2000).

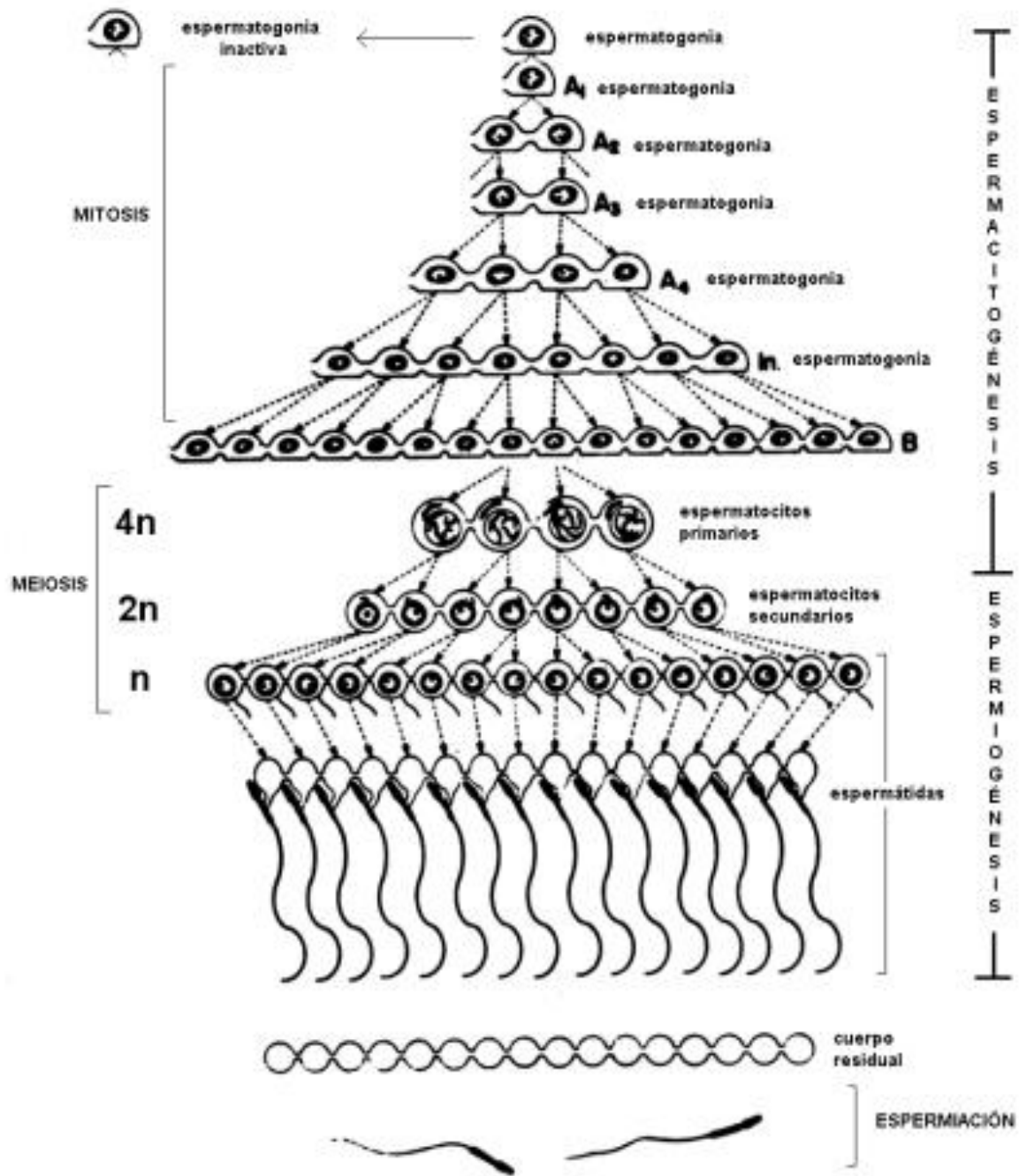


Figura 2. Esquema de la espermatogénesis

Fuente: (Klein, 2020)

2.3.3. Espermiogénesis

En este punto, las espermatidas esféricas se modifican en espermatidas maduras que se exponen al lumen de los túbulos seminíferos como espermatozoides (Arthur, 1992).

Para esta transformación es imprescindible que se dé un reagrupamiento de los orgánulos de las espermatidas maduras que finalizan como espermatozoides. Resumidamente, el núcleo se convierte en la cabeza, el aparato de Golgi genera el acrosoma y finalmente, las mitocondrias y centriolos proceden a desarrollar la cola. Una estructura denominada células de Sertoli, situadas sobre la membrana basal en los túbulos seminíferos, reservan gran parte del citoplasma, por lo cual, permite la regulación del paso de espermatidas maduras a espermatozoides (Simpson, 2000).

2.3.4. Espermiación

Básicamente esta etapa se refiere a la liberación de espermatozoides desde el compartimento basal de los túbulos seminíferos hasta el lumen (Simpson, 2000). Son liberados por exostosis hacia la luz y los cuerpos de residuo quedan en las células de Sertoli, las cuales no solo las fagocitan sino son reducidas a un número considerable de células germinales degeneradas en caso de procesos espermatogénicos ineficientes (Feldman & Nelson, 2007).

El transporte del espermatozoide hacia el epidídimo es ayudado por el abundante fluido testicular, elementos contráctiles de la cápsula testicular, células ciliadas del epitelio de los conductos eferentes y la pared del túbulo seminífero (Simpson, 2000).

2.3.5. Morfología del espermatozoide

El espermatozoide se define como una célula íntimamente específica con única función de fecundación del ovulo. En su estructura principal (cabeza) presenta mecanismo que se encargan de asegurar la penetración del ovocito y, a su vez, permitiendo la transmisión de material genético. La cola, por otro lado, presenta un mecanismo metabólico cuya función es de proveer el movimiento al espermatozoide (Illera, 1984). Corpóreamente se divide en:

- **Cabeza:** internamente se encuentra el núcleo y revistiendo su polo craneal se sitúa el acrosoma con sus enzimas. El acrosoma constituye un saco membranoso invertido con un segmento lipoglucoproteico que incorpora enzimas, como son la hialuronidasa y acrosina (Feldman & Nelson, 2007)
- **Pieza intermedia:** complejo de mitocondrias, alineadas en extremo en bandas enrolladas en espiral que forman una hélice y que realiza la función de garantía del metabolismo del espermatozoide y define su movilidad (Feldman & Nelson, 2007).
- **Cola:** con movimiento flagelar responsable de la llegada del espermatozoide. De sus dos centriolos en ubicación terminal de la pieza intermedia se destinan una serie de fibrillas hacia la cola, que presentan dos fibrillas en centro rodeadas de un anillo de nueve pares periféricos de fibrillas contráctiles, que garantiza el movimiento del espermatozoide (Feldman & Nelson, 2007).

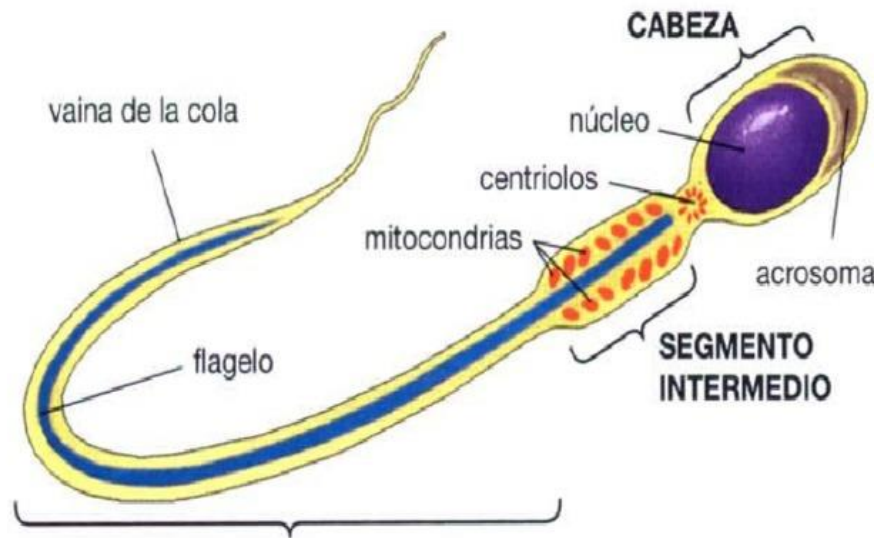


Figura 3. Morfología del espermatozoide

Fuente: (audestk, 2003)

2.4. Características del semen canino

El semen es eyaculado en tres fragmentos (Johnston, et, & al., 2008), la primera (fracción pre-espermática), originada posiblemente en la próstata, ausente de espermatozoides cumple la básica función profiláctica al desalojar elementos indeseables de la uretra (Feldman & Nelson, 2007). Su ph difiere entre 6.2 a 6.5 y su volumen entre 2.4 ± 1.8 ml (Simpson, 2000); la segunda (fracción espermática) posee mayor importancia al mantener una concentración espermatica elevada, provenientes de la cola del epididímo (Günzel-Apel, 1994), su ph oscila entre 6.3 a 6.6 y su volumen de 0.5 a 3.5 ml (Feldman & Nelson, 2007), la última fracción (fracción prostática) está compuesta por el líquido prostático y brinda mayor volumen al eyaculado total (Feldman

& Nelson, 2007), su ph varía entre 6.5 a 7.0, su volumen es proporcional a la actividad secretora de la glándula prostática y su media es de 6.48 ± 4.32 ml (Bruce, 1989).

El volumen de eyaculado difiere de entre 1 a 40 ml (Feldman & Nelson, 2007). La concentración espermática de un perro adulto es de los 200 millones/ml a 1000 millones/ml, obteniendo mayores valores los caninos de mayor tamaño (McDonald, 1991). Es de considerar que la cantidad de colección espermática depende de la cantidad de líquido prostático recogido (Feldman & Nelson, 2007).

(Aiello, 2000) indica valores normales de motilidad progresiva de entre 70 a 80%, donde un 75% de espermatozoides deben encontrarse en condiciones morfológicas normales (Feldman & Nelson, 2007). El ph seminal va desde 6.3 a 6.7, siendo dependiente en su mayoría de la cantidad de líquido prostático obtenido en la recolección.

2.5. Obtención de espermatozoides caninos de la cola del epidídimo

Actualmente se describen diversos métodos para la obtención de los espermatozoides caninos. Entre la más conocida tenemos el lavado retrogrado con un “medio de lavado”. Esta técnica consiste en introducir una jeringa en los vasos deferentes con un medio líquido o dilutor, que no se considere dañino para los espermatozoides, hacia la cola epididimaria que ha sido separada del resto del cuerpo, de manera que se obtenga los espermatozoides por presión. Dicha técnica es considerada la más apta al momento de recolección de los espermatozoides epididimarios, pues la muestra obtenida no se contamina demasiado y demuestra mejor calidad seminal en comparación con otros métodos (Martínez *et al.*, 2006).

2.6. Principios biofísicos de la crioconservación.

2.6.1. Efecto de la temperatura y osmolaridad en el ambiente celular.

El proceso de la criopreservación del semen comprende variables cambios intracelulares que pueden conllevar a una disminución de la supervivencia espermática. El manejo de la alteración de temperatura, osmolaridad son los principales aspectos para fomentar una viabilidad requerida (Restrepo et al., 2017).

Durante la ejecución de enfriamiento y congelación, el espermatozoide es sujeto de cambios bruscos de su medio físico y químico. Uno de los cambios toma parte intracelularmente cuando el agua en su estado líquido pasa a sólida en forma de cristales. La presencia del primer núcleo de hielo o nucleación, acontece cuando la solución llega a temperaturas de entre -5 a -15°C. Este núcleo, de apariencia hexagonal, permite la adhesión de moléculas de agua mediante interacciones electrostáticas que promueven la formación de núcleos de tamaño más prominente (Robles et al., 2005).

La osmosis constituye un caso especial de difusión, que estudia el movimiento del disolvente y se define en función de solutos. Es definida como el movimiento del agua desde soluciones de baja concentración de solutos hacia soluciones de alta concentración de solutos. Las células criopreservadas se deben rescatar a temperaturas desde -133°C a -196°C en nitrógeno líquido, justificado porque a esta temperatura no existen fenómenos de difusión ni energía térmica suficiente para fomentar reacciones químicas. Por lo mismo las dificultades de la congelación no estriban de la permanencia a temperaturas bajas. (Ávila et al., 2006)

La injerencia celular crio inducida se expresa en función del hielo intracelular y el estrés osmótico al que son sometidas las membranas celulares durante la congelación.

Michelmann, (2006) añade que la hipótesis del volumen celular mínimo que relaciona el efecto de deshidratación producida durante la concentración de solutos y la muerte celular con la vuelta a condiciones isotónicas después de la congelación, el volumen celular mínimo se basa en que el volumen se reduce en relación al aumento de la osmolaridad extracelular, a medida que la célula pierde volumen por la pérdida de agua, la compresión del contenido citoplasmático aumenta la resistencia de la célula a seguir perdiendo volumen, por lo cual, al exceder la resistencia física de la membrana se producen cambios irreversibles en su permeabilidad, en dicho caso los crioprotectores actúan reduciendo (por sus cualidad coligativas) la cantidad de hielo formado a la temperatura determinada (Ávila et al., 2006).

La velocidad de enfriamiento desempeña una función esencial en este sentido. Si la congelación se realiza de manera lenta, el equilibrio se obtiene a través del flujo de agua, por el contrario, si es muy rápida, la célula no alcanza a disminuir sus niveles de agua lo suficientemente rápido para obtener el potencial de equilibrio, llevando a la congelación intracelular (Robles et al., 2005).

2.6.2. Criopreservación

La criopreservación tiene como objetivo preservar células o tejidos a bajas temperaturas, usualmente entre los -80°C y -196°C , deteniendo así su función vital y manteniéndolo a condiciones suspendidas por un tiempo indeterminado. A una temperatura acorde las reacciones bioquímicas que puedan llegar a producir la muerte de la célula, quedan suspendidas. Para tener éxito en la criopreservación de semen depende de factores que están relacionados como la calidad de semen, la composición del diluyente, el crioprotector, el enfriamiento y la descongelación (Portillo et al., 2006).

La congelación en nitrógeno líquido se conoce como la más empleada para congelar y conservar el semen canino u otra especie, durante un tiempo indefinido (England, 1993). Se describen innumerables propiedades, entre las principales su transporte por largas distancias, disminución de gastos e incluso riesgos poco sanitarios que define el apareamiento natural (Betancur et al., 2011).

2.7. Congelación de espermatozoides epididimarios caninos.

2.7.1. Criopreservación de espermatozoides del perro

La criopreservación de los espermatozoides epididimarios es una técnica eficaz para conservar el potencial genético de los perros, esto cuando no sea posible recolectar espermatozoides eyaculados (Prapaiwan et al., 2016).

El método para evaluación de los espermatozoides epididimarios del canino es el mismo empleado para eyaculados del semen del bovino (Root-Kustritz, 2011).

Al intentar congelar los espermatozoides epididimarios debemos tomar en cuenta una gran diferencia con el semen eyaculado. Al referir el epidídimo anatómicamente, este se encuentra dividido por cabeza, cuerpo y cola; aunque en un tubo continuo. Dentro de esta estructura se da la maduración morfológica y funcional del espermatozoide (Portillo et al., 2006). El paso de estos por el epidídimo sugiere una variación en su forma como reducción del tamaño acrosomal y pérdida de gotas citoplasmáticas unidas a la pieza media. Por lo mismo, la escasa semejanza en forma física de los espermatozoides puede influir en la susceptibilidad al cambio osmótico y la sensibilidad al choque de frío durante el congelamiento/descongelamiento (López, 2020).

Existe algunos factores durante el proceso de criopreservación, como la composición del diluyente, el empleo de crioprotectores para la protección de las

membranas celulares al shock térmico, pero en concentración suficiente para evitar toxicidad (Hezavehei et al., 2018).

Varias metodologías se han expuesto para la congelación del semen canino, variando dependiendo del tipo de dilución empleado, agentes crioprotectores, etc. En cualquier caso, se busca reducir el daño que ocasiona el procesamiento, con fin de obtener un número máximo de espermatozoides (Chirinéa et al., 2006).

El método más conocido es el usado por Andersen, (1975), quien emplea el dilutor tris, yema de huevo y glicerol a 37°C. Luego se procede con un periodo de equilibrio de tres horas, continuando con el envase en pajilla para posteriormente transferir a un refrigerador programado a 5°C por hora y, para concluir, se exponen las pajillas al vapor de nitrógeno por 20 minutos, almacenándolo en termo criogénico.

2.7.2. Efecto de diluyentes y crioprotectores sobre el ambiente celular.

. Las funciones de los diluyentes y crioprotectores durante el proceso de preservación celular, lleva como fin conservar la viabilidad de la célula por un periodo indeterminado. Esta sustancia ejecuta el ejercicio de incrementar el volumen eyaculado, protección del espermatozoide a la acción de toxicidad de productos de metabolismo celular y de los cambios súbitos de temperatura (Ugur et al., 2019).

2.7.2.1. Efecto de crioprotectores sobre el semen.

Su acción se puede clasificar en dos grupos de acuerdo a la permeabilidad de la membrana a la exposición de la sustancia. En el primer grupo se clasifican aquellas sustancias que tienen bajo peso molecular y, por lo mismo, penetra en el citoplasma celular, cuales son: el glicerol, etilenglicol, butanediol, 1,2-propanodiol, metanol, dimetil sulfóxido (DMSO), acetamida. En el segundo grupo se encuentran las sustancias que no

penetran en la membrana, esto se debe a su alto peso molecular, y son: la albumina, el polivinil alcohol (PVA) y el hialuronato de sodio (Cárdenas, 2013).

El empleo de los crioprotectores no permeables se debe a que remueve osmóticamente el agua intracelular, y se reemplaza por crioprotectores permeables durante el enfriamiento y adicional para evitar el choque osmótico al controlar la rehidratación intracelular en el proceso de descongelación (Futino, 2008).

La temperatura adecuada para la incorporación de los crioprotectores a la solución seminal y el tiempo de exposición celular, va a depender del grado de toxicidad y de la velocidad de difusión por la membrana plasmática. La difusión puede verse perjudicada por el descenso de temperatura, pues en el curso del proceso la membrana celular va a aumentar las porciones de colesterol con el fin de lograr una estabilidad mecánica; sin embargo, el aumento del colesterol también lleva a una disminución de la permeabilidad a moléculas pequeñas, provocando, a su vez, un defecto en la penetración del crioprotector en la célula (Futino, 2008).

2.7.2.2. Efecto de diluyentes sobre el semen.

Tanto para la congelación como para la refrigeración de esperma, se utiliza un agente para proteger el esperma de cualquier efecto crítico del proceso de congelación. Por eso es necesario utilizar un buen dilutor que contenga una buena cantidad de nutrientes, que proteja contra el efecto nocivo del enfriamiento rápido, que no haya alteraciones del pH, promover una presión osmótica y concentración de electrolitos, un crioprotector para que reduzca el daño celular del esperma durante la congelación y posterior descongelación (Condoy & Cevallos, 2017). En la actualidad el dilutor más empleado para conserva semen canino es a base de la yema de huevo como protector

de enfriamiento, Tris-citrato como agente tampón, glucosa o fructosa como agente de energía y el glicerol como agente crioprotector (Diaz, 2015).

Una dilución excesiva puede desencadenar en una pérdida permanente de motilidad, capacidad fecundante y actividad metabólica de la célula. También puede conllevar a una disminución en la fracción de efectos benéficos de sustancias presentes de los fluidos testiculares y epididimarios (Silva, 2007).

2.7.3. Envasado

La tasa de congelación varía considerablemente, dependientes del método empleado para envasar. Por lo regular, el espermatozoide se congela en pajillas de plástico, proporcionando un ambiente adecuado para manejo, rotulado, almacenaje y el posterior descongelamiento. (Feldman & Nelson, 2007).

2.7.4. Descongelación

El proceso sentencia ser dañino para los espermatozoides, por los efectos atribuidos a la recristalización de microcristales de hielo intracelular, cuando se realiza lentamente; o, por otro lado, debido a la deformación brusca del volumen, cuando al descongelar se lo hace rápidamente; asimismo por alteraciones de estructura y función de la membrana plasmática (Feldman & Nelson, 2007).

Por lo tanto, así como en procesos de congelación se provee de un protocolo, también en el proceso de descongelación destacamos diferencia en temperatura y velocidad (Bruce, 1989). Futino (2008) nos propone el descongelamiento a baño maría para las pajuelas difiriendo temperaturas de 1°C, atravesando de 30°C a 37°C; o hasta de 70°C hasta 75°C.

Generalizando, debemos tener presente que la tasa de descongelación varía dependiendo de la tasa de congelación para una supervivencia requerida. En la actualidad, la temperatura que más se emplea varía de 37°C a 75°C (Futino, 2008).

2.8. Análisis microscópico post congelación

Ya que las células pueden sufrir variaciones en sus capacidades fecundantes tras ser sometidas a la criopreservación, la evolución microscópica permite observar detenida y claramente al microscopio las cualidades espermáticas como fueron motilidad individual progresiva, morfología, vitalidad, integridad y funcionalidad de la membrana plasmática.

2.8.1. Evaluación de la motilidad individual progresiva

Esta prueba se realiza para tener la aproximación de la calidad del semen. Para su evaluación se necesita un microscopio compuesto u óptico con objetivos de 10X Y 40X(aumentos). Se debe colocar una gota de 10 µl sobre un portaobjetos a 35 °C y colocando un cubre objetos para observar a un aumento de 40X al menos cinco veces, en diferentes sitios de la preparación, con la finalidad de tener un criterio general y estimar el porcentaje de espermatozoides con movimiento (Rodríguez et al., 2018).

El movimiento normal de los espermatozoides es rápido y recto. Se clasifican como:

Cuadro 1. Escala de evaluación de la motilidad individual progresiva.

Valor	Porcentaje	Clase	Descripción
5	100%	Muy buena	Movimiento progresivo rectilíneo muy rápido.
4	80%	Buena	Movimiento progresivo rápido.
3	60%	Regular	Movimiento progresivo lento y ondulado.
2	40%	Pobre	Movimiento anormal, en ocasión progresivo.
1	20%	Muy pobre	Movimiento giratorio sobre sí, no progresivo.
0	0%	Muertos	Inmóviles.

Fuente: (Rodríguez et al., 2018)

2.8.2. Determinación de la morfología y vitalidad espermática

El método habitual es la tinción con eosina-nigrosina, que es utilizado para la evaluación de la morfoanomalías (Sánchez et al., 2018). Este proceso muestra las células vivas de color blanco sobre un fondo purpura, o teñidas de rosa si están muertas. La evaluación morfológica del espermatozoide se debe realizar al microscopio, una vez examinados 100 espermatozoides, se clasifican en vivos y normales, o muertos y/o anormales (Hermansson & Forsberg, 2006). Las anomalías pueden presentarse en la cabeza como protuberancias, cuello torcido o desprendido, acrosomas rotos o defecto del cráter; en la pieza intermedia como mitocondrias alteradas p gota citoplasmática y en la cola torcida o enrollada. Sin el examen morfológico seminal cualquier valoración seminal es incompleta (Hernández, 2007). El inconveniente que presenta esta tinción es que puede producir morfologías anormales en la cola de los espermatozoides (Sánchez et al., 2018).

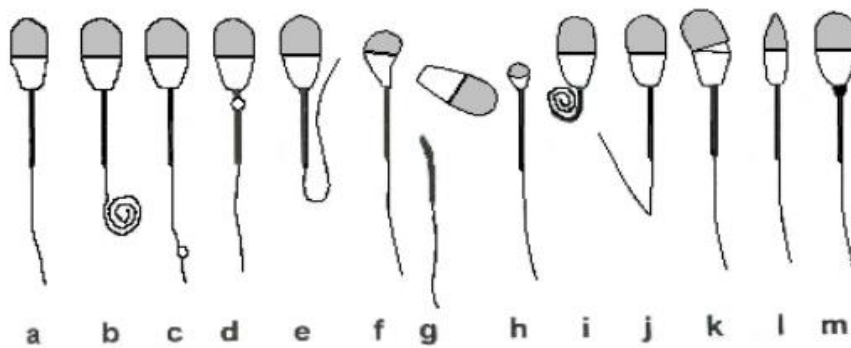


Figura 4. Frecuentes anomalías morfológicas en los espermatozoides del canino.

Fuente: (Johnston et al., 2008).

2.8.3. Test de HOST

La prueba Hipoosmótico o Test de Endósmosis (HOST) nos permite evaluar la integridad funcional de la membrana de los espermatozoides, está relacionada

directamente con la capacidad fecundante. Este test se encarga de analizar alteraciones morfológicas que sufren las células espermáticas al ser expuestas a condiciones hipotónicas como es el incremento del tamaño y flagelos flectados o curvos. Se ha observado que la suspensión de espermatozoides en un medio hipotónico ocasiona un desequilibrio osmótico entre el medio extracelular y el intracelular, como consecuencia, el espermatozoide aumenta su volumen con consecuentes cambios morfológicos en los flagelos, como dilatación y enrollamiento de los mismos (Sanchez et al., 2002).

El test de funcionalidad de membrana HOST se realiza usando una dilución de semen en relación de 1:10 en solución de dextrosa al 5% (252 mOsmol/L), incubándose en baño maría por un periodo de 25 minutos a 25°C, y observación con microscopio (40X) (Hernandez & Gonzalez, 2015).

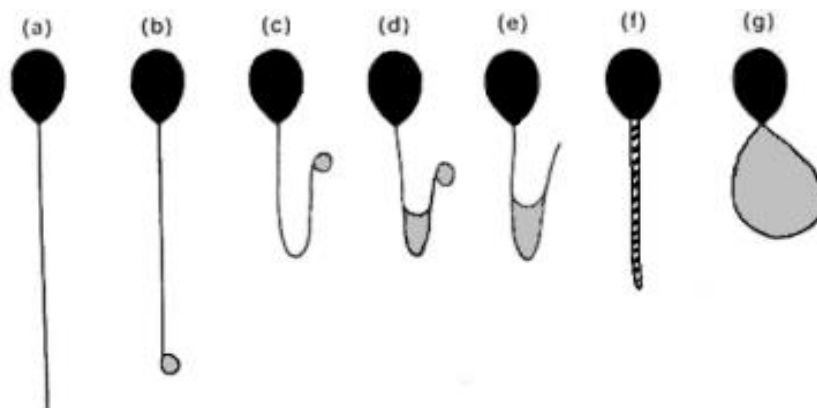


Figura 5. Representación esquemática de la apariencia morfológica de un espermatozoide no reaccionante (a) y reaccionante (b,c,d,e,f,g) al Test de Host.

Fuente: (Jeyendran, 1984).

2.8.4. Integridad de la membrana plasmática (Ioduro de propidio).

Es una tinción roja fluorescente específicos del ADN por lo mismo sirve como tinción espermática de contraste. En combinación, permiten una evaluación rápida,

simple y sin ambigüedad del daño al saco acrosomal y la membrana plasmática. (Salinas et al., 2014).

El yoduro de propidio desprende una fluorescencia rojiza cuando la membrana se ha perjudicado tras el proceso de congelación. Las células viables poseen la capacidad de evitar el ingreso de colorantes, por lo cual, este test es un exponente de la integridad de la membrana plasmática (Abarca & Madrigal, 2018).

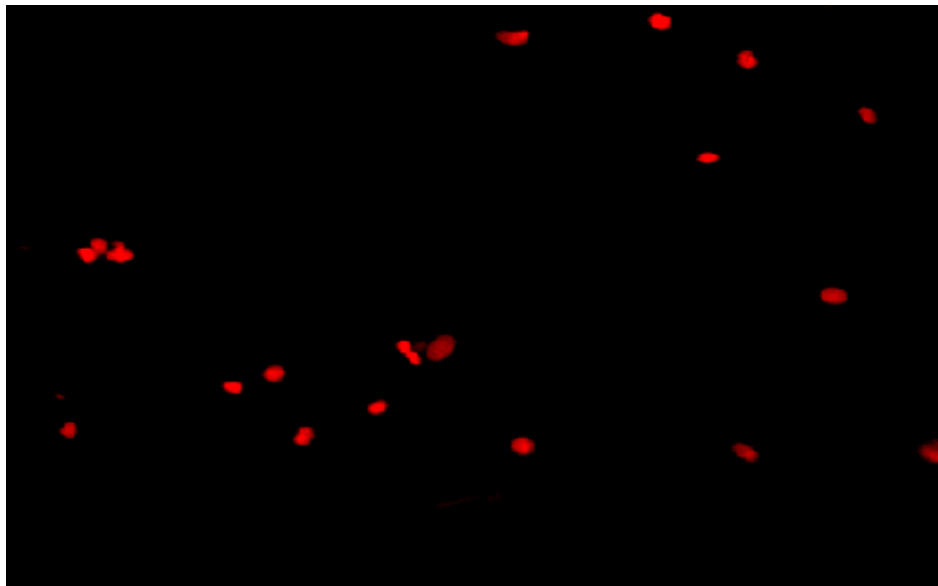


Figura 6. Evaluación de la integridad de la membrana plasmática con fluorescencia realizada con yoduro de propidio.

Fuente: (Armas, 2011).

III. CAPÍTULO

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Tipo de Estudio

Se trata de un estudio experimental y de correlación. Este estudio se basa en la implementación de diferentes pruebas de laboratorio que nos guían hacia la selección de un paradigma que cumpla y resuelva nuestro objetivo. Por lo mismo, se realizó el análisis de las variables de la condición corporal, morfometría testicular y de las características espermáticas, por lo que es un estudio analítico.

3.2. Ubicación del ensayo

El presente estudio se realizó en la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Católica de Cuenca, Laboratorio de Reproducción.



Figura 7. Izq. Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias. Lab. Reproducción

Fuente: Google maps.

3.3. Materiales

3.3.1. Físicos

- Guantes de examinación estériles
- Guantes de nitrilo
- Cooler
- Jeringas
- Rejilla
- Frascos de muestra de orina
- Pipetas
- Tubos eppendorf
- Tubos falcón
- Pajillas

3.3.2. Químicos

- Solución salina fisiológica
- Eosina/nigrosina
- Test de HOST
- Ioduro de propidio
- Nitrógeno líquido

3.3.3. Equipo

- Refrigeradora
- Microscopio
- Centrifugadora
- Platina

- Microscopio de fluorescencia
- Baño María

3.3.3. Materiales de Experimentación

- Testículos del perro

3.4. Metodología

3.4.1. Toma de datos y recolección de muestras.

Se tomó las referencias del paciente mediante la anamnesis en una ficha que constaba con los datos de: condición corporal (constitución, temperamento); edad (clasificado entre jóvenes [<5 años]; adultos [de 5 a 10 años] y geriátricos [>10 años de edad]); peso (pequeño [3 a 9 kg]; medianos [10 y 25 kg] y grandes [26 a 50 kg]; raza (raza y mestizos) y color (blanco, negro, mixtos).

Luego se procedió a la recolección de muestras a través de la cirugía de orquiectomía, la cual consiste en la extirpación quirúrgica de ambos testículos. Durante el procedimiento, se realizó un abordaje hacia los testículos mediante la piel y tunicas protectoras. Ya aislados los testículos se ligó el conducto deferente y vasos y suturamos tunicas y piel. Una vez extraídos los testículos, los colocamos en solución salina (NaCl al 0,9%) y se transportó al laboratorio en un cooler. El tiempo estimado entre recolección y transporte se estima entre media hora a 6 horas.

G #169
Canino - 2 años

- Infección Bacteriana.
- Acido Ablandante Mowlon
- Dosis Hoiles 1S - 4.

U Universidad Católica de Cuenca

CIRUGÍA VETERINARIA
Cédula: 0019162688
Raza: Mestizo
Peso: 28.2 Kg Cond corporal 3/5

Propietaria: Wilson Gubvarcala
Número de la mascota: Steven
Sexo: Macho

A QUE HORA COMO POR ULTIMA VEZ? *Apex 1:30 pm*

Cirugía anteriores: No	Tiene apetito: Si	Vomito: No	Diarrea: No
Pérdida de peso: No	Perfil fébril: No	Disenteria: No	Temperatura: 37.4
% de deshidratación: 1 seg	Color de las mucosas: Rosadas	Uremia capilar: 2 seg	
Frecuencia respiratoria: 24	Frecuencia cardíaca: 140 /pm	Comediones: 1/2	

Examen físico + diagnóstico: _____ Costo de la consulta: _____

PROTOCOLO DE ANESTESIA Y CIRUGIA (pasos a seguir en nuestro establecimiento)

Tarea	Responsable
Revisión pre quirúrgica	Veterinario
Admisión (en su momento) registrar	Asesistente
Pasejo del animal	Veterinario
Preparación de la pre medicación (vit K, antibiótico y para el dolor)	Veterinario
Administración de la premedicación	Auxiliar
Preparación del quirófano (sala y material necesario)	Veterinario
Administración de la inducción, pre anestesia y canalización CL O R	Auxiliar
Procedimiento quirúrgico	Veterinario
Tratamiento postoperatorio	Veterinario
Hospitalización (vigilar la recuperación)	Auxiliar
Emergia del quirófano	Veterinario
Contacto del cliente tras la cirugía	Auxiliar
Contacto y recepción del paciente	Veterinario

ORDENAMIENTO QUIRURGICO

_____ ANESTESIA QUIRURGICO + HIDRATACION IV + PRE ANESTESICOS + ANESTESIA + OXIGENO (OPCIONAL) + MATERIAS ANALGESICOS, ANTIINFLAMATORIOS + RECONSTITUYENTES + HOSPITALIZACION (OPCIONAL)

Autorizo por el presente instrumento para que G.A.D. del Municipio de Cuenca y la Universidad Católica de Cuenca, a través de su equipo veterinario, realice el diagnóstico, tratamiento médico e intervención quirúrgica al paciente de mi propiedad de acuerdo a lo solicitado, intervenciones que se realicen bajo mi participación y autorización, por lo tanto, como al Gobierno Autónomo Descentralizado del Municipio de Cuenca y la Universidad Católica de Cuenca y a su personal de salud, responsabilidad que corresponde a los posibles resultados adversos que puedan generarse a raíz de la práctica de dichas intervenciones médicas, por lo tanto, comprometo el tratamiento o intervención quirúrgica, nada tendrá que responder a los señores, representantes, asistentes o personal médico veterinario de Gobierno Autónomo Descentralizado del Municipio de Cuenca y la Universidad Católica de Cuenca. Comprometo también a pagar todos los gastos generados por la atención de mi mascota.

Diagnóstico / Cirugía: *Castración* Nombre del propietario: *Wilson Gubvarcala*
 Numero de cédula: *0130028430* Firma: _____

Figura 8. Registro del paciente

3.4.2. Análisis morfométrico y extracción de espermatozoides.

Los testículos fueron procesados en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Católica de Cuenca. Con protocolos, en rigor, asépticos se limpió los rezagados del testículo para proceder a registrar los datos morfométricos intrínsecos, medidos con un calibre, como fueron: peso, ancho, largo y profundidad.



Figura 9. Análisis morfométrico

Los espermatozoides del epidídimo se recolectaron mediante el proceso de flujo retrogrado, descrita por Gutiérrez et al., (2004), la cual consiste en: limpiar

cautelosamente la cola del epidídimo junto con el conducto deferente para remover tónicas y vasos con una tijera punta roma. Posteriormente, localizamos en el septum del epidídimo equivalente a la porción cercana de la región media del conducto deferente. Al tiempo, colocamos el fragmento, libre de capa visceral, en un tubo falcón.

Las agujas de insulina se ajustaron a una carga de 0,5cm con el “medio de lavado” (diluyente Tris+Yema de huevo) y se insertaron en el lumen de la sección libre de cada vaso deferente para obtener la mayor cantidad de espermatozoides epididimarios maduros. Finalmente, se perfundía en los conductos, abultando la cola del epidídimo para deslizar el contenido espermático a través del tubo, obteniendo nuestro ejemplar para evaluación.



Figura 10. Recolección de muestra

3.4.3. Congelación de esperma.

Con la alícuota se evaluaron los test correspondientes y la concentración espermática; ajustando una concentración de 100×10^6 espermatozoides/ml., necesaria para poder empajuelar la muestra, manteniendo proporcional al contenido del diluyente (Tris+yema de huevo) más el crioprotector (Glicerol). Posterior a ello, se refrigeró las pajuelas durante dos horas a 5°C . Tras lo cual se colocan sobre una trampa de flotación

a 4cm de altura sobre vapores de nitrógeno líquido, en un tiempo de 15 minutos. Transcurrido el tiempo descrito, se sumergieron directamente en el nitrógeno para la congelación manteniendo a temperatura constante de -196°C .



Figura 11. Pajuelas sumergidas en nitrógeno líquido.

3.4.4. Descongelación y evaluación de los espermatozoides

Las pajillas se descongelaron sumergiéndolas en baño maría durante 30 segundos.

Los factores evaluados fueron: Motilidad individual progresiva, integridad de la membrana plasmática, vitalidad espermática y viabilidad.

3.4.4.1 Características microscópicas

- **Motilidad individual progresiva**

Para poder evaluar la motilidad individual progresiva tomamos $10\ \mu\text{l}$ de la muestra y lo colocamos en un portaobjetos. Observamos en el microscopio con el lente de 40X. Se evaluó subjetivamente y de manera relativa a la siguiente tabla de interpretación a escala de 0 a 5 (0 – 100 %).

- **Viabilidad espermática: Test de HOST**

El test hiposmótico se empleó para analizar la viabilidad espermática, fundamentada en el desequilibrio osmótico entre el espacio intracelular y extracelular en que se suspende a la célula; fisiológicamente compensada por esta al desprender agua al medio intracelular, consiguiendo una hipoosmolaridad que conlleva a cambios morfológicos tales como: dilatación y enrollamiento de flagelos. Su análisis se mide con un objetivo de 40X, mostrando la capacidad fecundante de los espermatozoides.

El método del test de HOST se realiza mezclando 50 μ l de preparación de HOST con 10 μ l de muestra, luego dejamos incubar a baño maría durante 25 minutos. Posteriormente se toma 10 μ l y depositamos en un portaobjetos, y superponiendo un cubreobjetos se observa al microscopio; donde observamos, en uno o más campos, espermatozoides viables con un cambio en su cola, a manera de hélice, como consecuencia de la hinchazón. Al contrario, también se pudo observar espermatozoides exánimes sin ningún defecto. Expresando de esta manera el porcentaje viable de los espermatozoides.

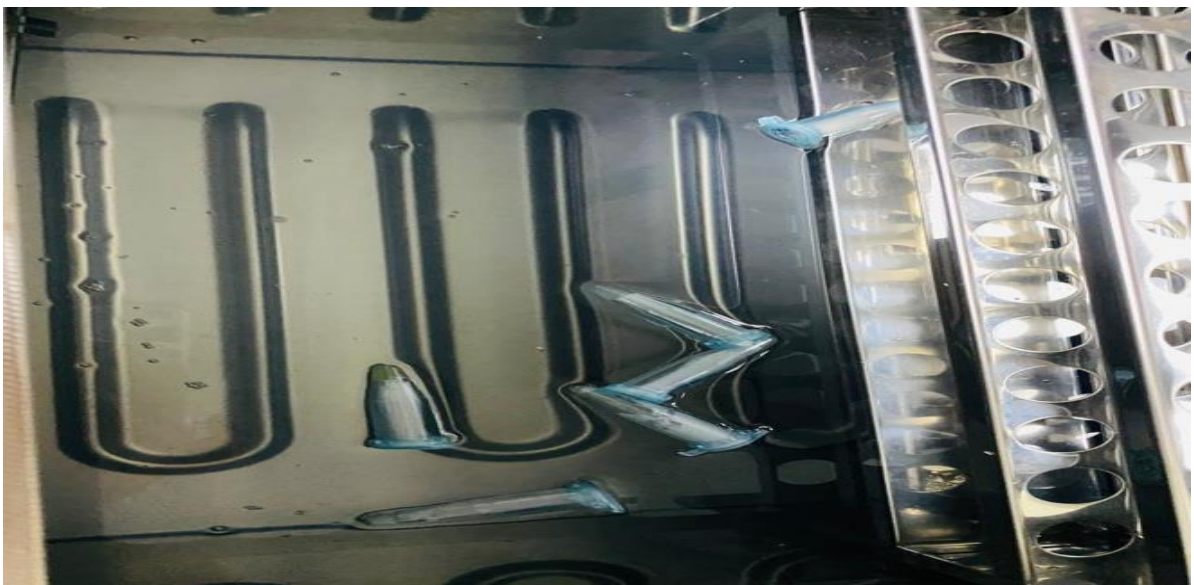


Figura 12. Test de HOST sumergido a baño maría

- **Vitalidad espermática: Tinción eosina – nigrosina**

Esta tinción se elaboró al mezclar 10 µl de muestra y 10 µl de tinción de eosina – nigrosina; realizamos un frotis y dejamos secar durante 3 minutos, cuando la muestra se encuentra seca procedemos al conteo de vivos y muertos. Para determinar el porcentaje se ejecutó el conteo en uno o más campos del portaobjetos hasta contar 100 células.

Espermatozoides vivos: se distinguen por su coloración blanquecina, es decir, sin tinción de eosina.

Espermatozoides muertos: fácilmente identificables por su rasgo de coloración purpura sobre la célula, es decir, con tinción de eosina.

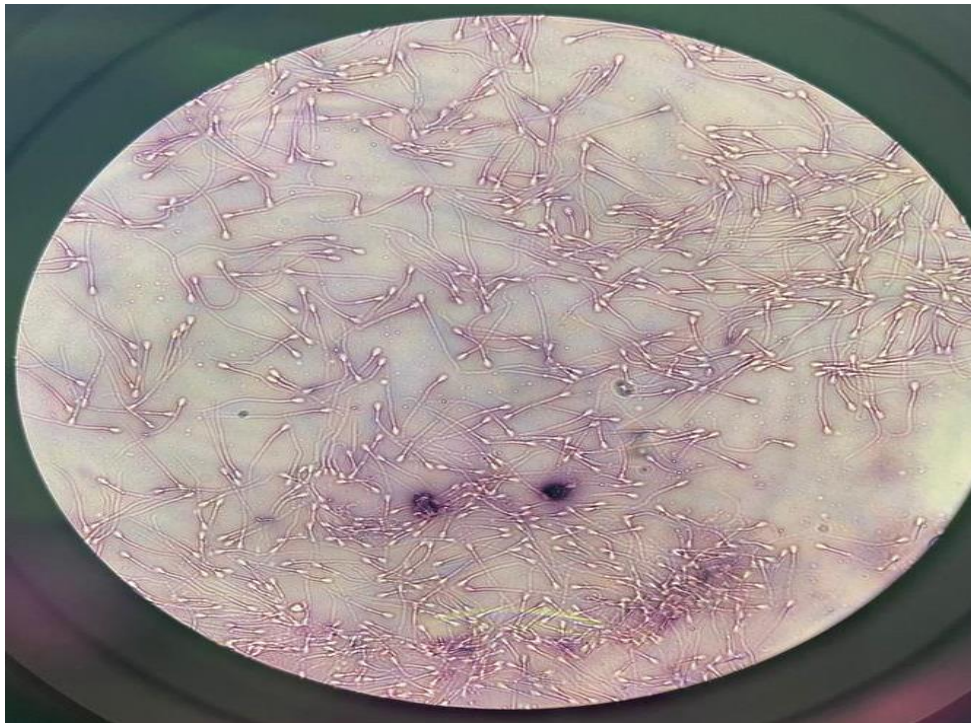


Figura 13. Test de eosina-nigrosina al microscopio.

- **Integridad de la membrana plasmática: Ioduro de propidio**

Se desarrolló tomando 10 µl de la muestra y añadiendo, sin permitir el ingreso de luz, 2 µl de ioduro de propidio. Colocamos sobre un portaobjetos y realizando un frotis

dejamos secar sobre la platina durante 1 minuto y observamos al microscopio con objeto 40X. Expresamos un porcentaje de acuerdo a la cantidad de células que presentaron coloración roja, observando en diferentes campos de distribución hasta completar 100 células. Los espermatozoides que tienden a una tinción rojiza indican el daño de la membrana plasmática.

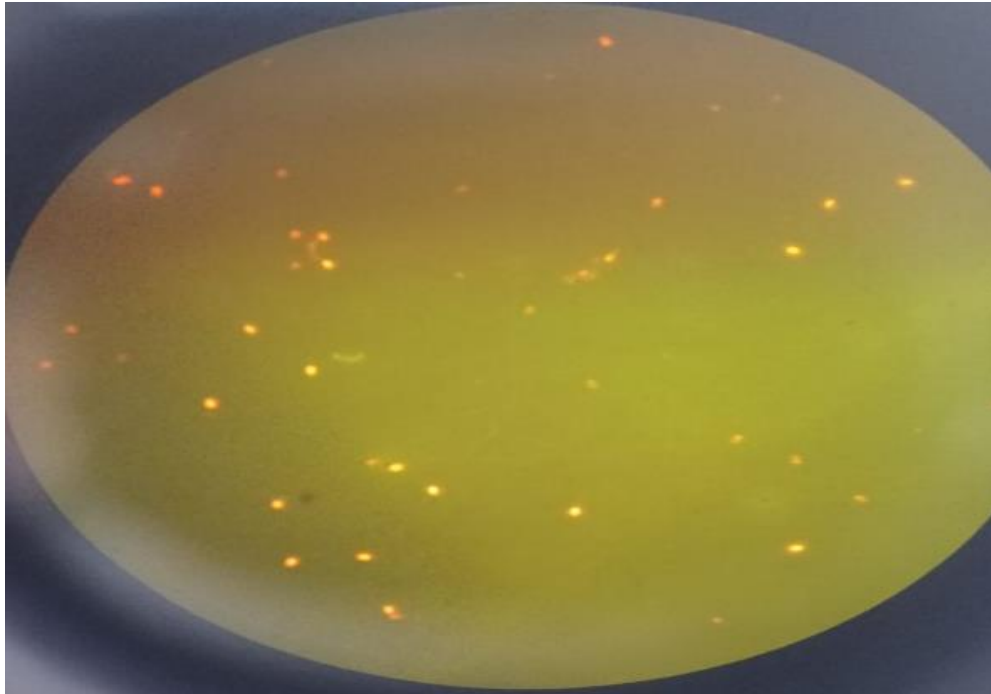


Figura 14. Test de Ioduro de propidio al microscopio.

3.4.7. Diseño experimental

Se evaluó el producto obtenido mediante un diseño de contingencia, con una población inicial de 26 perros para la correlación.

3.4.7.1. Variables de inclusion.

- Caninos mayores a 6 meses de edad.

3.4.7.2. Variables de exclusion

- Caninos enfermos o con problemas geriátricos
- Caninos con diagnóstico poco favorable.

3.4.7.3. Variables independientes del experimento

Características corporales:

Tamaño testicular (mm)

Edad (Jóvenes, adultos, geriátricos)

Perro (Kilogramos)

3.4.7.4. Variables dependientes del experimento

Motilidad individual progresiva (%)

Integridad de la membrana (%)

Funcionalidad de la membrana (%)

Anormalidades (%)

Vitalidad (%)

3.4.7.6. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se empleó el test de varianza (ANOVA), para determinar la relación del peso, diámetro, largo y ancho del testículo en relación con la edad, las características cualitativas y cinéticas de los espermatozoides epididimarios congelados/descongelados y los diferentes grupos etarios, condición corporal y características corporales. Para mostrar los resultados se utilizaron la desviación estándar, descripción de grafico de pasteles.

IV. CAPÍTULO

4. RESULTADOS

Luego del análisis de los resultados obtenidos pre y post congelación del semen, se tomaron en cuenta los parámetros que se clasifican a continuación:

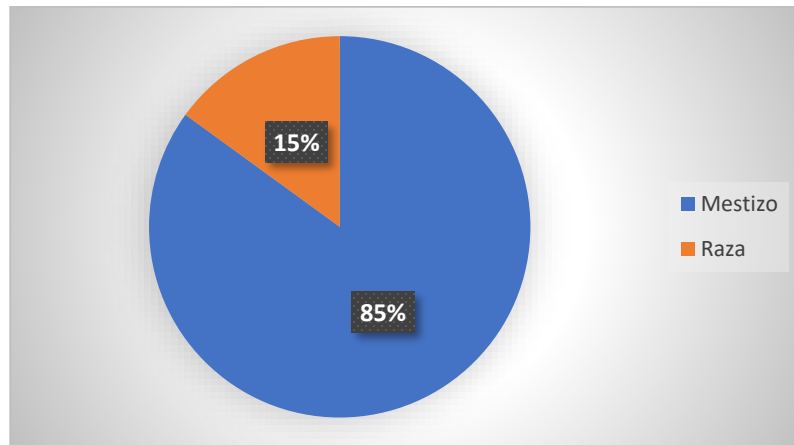


Figura 15. Promedio de las razas de los perros.

El 85% de los pacientes que fueron evaluados era mestizos, el restante se distribuyó en perros de raza con un 15%.

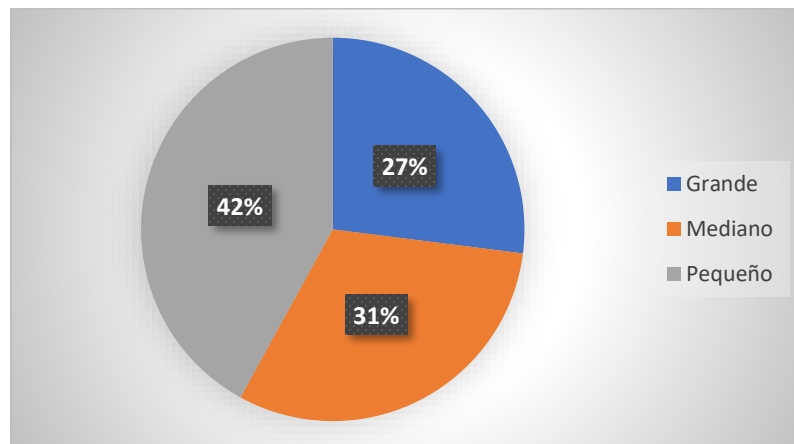


Figura 16. Promedio del tamaño de los perros

La figura número 16 nos muestra que el predominante, con un 42%, son de tamaño pequeño, con 31% mediano y con mínima cantidad de tamaño grandes con un 27%.

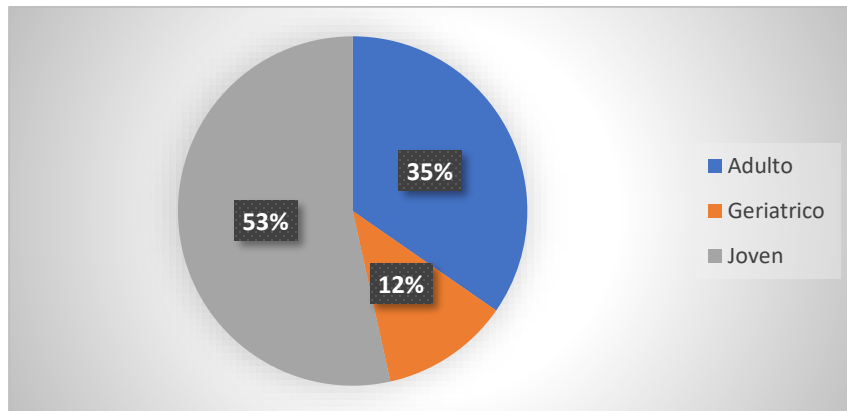


Figura 17. Promedio de la edad de los perros.

Observamos un mayor porcentaje en perros jóvenes con el 53%, prosigue con un 35% en perros adultos y con un 12% geriátricos.

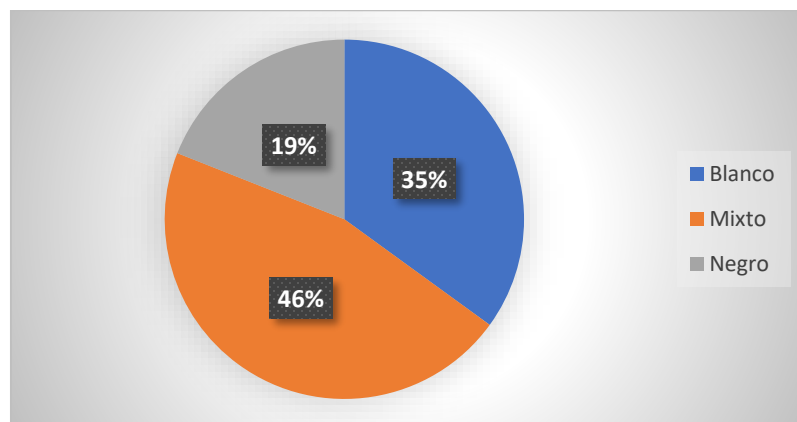


Figura 18. Promedio del color de los perros

En cuanto al análisis de la figura 18, demuestra un mayor número en perros de colores mixtos con el 46%, seguido del blanco con el 35% y por último tenemos un 19% de color negro.

A continuación, en el siguiente cuadro se resume las dimensiones en relación al Peso, Raza y Edad, que servirán como referencia para el análisis de este estudio.

Cuadro 2: Dimensiones en relación al Peso, Raza y Edad

FACTOR	n	Peso (g)	Ancho (mm)	Largo (mm)	Profundidad (mm)
EDAD					
Geriátrico	3	11,80 \pm 6,25	18,67 \pm 5,69	35,00 \pm 6,56	32,33 \pm 4,04
Adulto	9	13,29 \pm 5,76	23,00 \pm 6,34	29,22 \pm 9,67	26,33 \pm 7,23
Joven	14	14,89 \pm 5,44	24,79 \pm 10,98	31,29 \pm 10,78	24,29 \pm 4,10
RAZA					
Mestizo	22	14,26 \pm 5,80	24,23 \pm 9,49	30,55 \pm 10,55	24,73 \pm 5,02
Raza	4	12,25 \pm 3,56	19,25 \pm 4,99	33,50 \pm 4,20	32,50 \pm 5,74
TAMAÑO					
Pequeño	7	17,20 \pm 3,50	20,29 \pm 6,58	35,57 \pm 10,77	30,00 \pm 7,92
Mediano	8	12,58 \pm 4,19	21,88 \pm 8,77	34,13 \pm 7,83	24,63 \pm 2,00
Grande	11	12,95 \pm 6,79	26,64 \pm 10,25	25,82 \pm 8,82	24,27 \pm 5,18

Se muestra un conglomerado de Distancia Euclidiana Raza y Tamaño (Proporcional al Peso, Ancho, Largo y Profundidad), donde se observa que animales de Raza y Pequeños, tienen diferentes tamaños ($p < 0,05$) en relación a las demás combinaciones.

El Conglomerado (Proporcional al Peso, Ancho, Largo y Profundidad) de Distancia Euclidiana Raza y Edad, donde se observa que animales de Raza Geriátricos, tienen diferentes tamaños ($p < 0,05$) en relación a las demás combinaciones.

El Conglomerado (Proporcional al Peso, Ancho, Largo y Profundidad) de Distancia Euclidiana Tamaño y Edad, donde se observa que animales Jóvenes pequeños y Adultos pequeños, tienen diferentes tamaños ($p < 0,05$) en relación a las demás combinaciones.

Cuadro 3. Análisis de los Paramentos Funcionales del semen del perro.

	ANTES		DESPUES		p	T
	LI (95%)	LS (95%)	LI (95%)	LS (95%)		
MIP	58%	80%	40%	58%	0,0062	2,86
Vigor	3,46	4,24	1,35	2,34	<0,0001	6,54
Concentración (x10⁶)	101,14	410,01	sd	sd		
Vitalidad	68%	79%	46%	64%	0,0007	3,66
Anormalidad	21%	32%	36%	54%	0,0007	-3,66
Host	52%	69%	20%	37%	<0,0001	5,45
Ioduro de Propidio	70,27	102,8	38,78	65,3	0,0014	3,39

En la Movilidad individual progresiva (MIP), la muestra se encuentra dentro de los parámetros establecidos en el momento antes (IC95%) de la congelación (58% a 80%), y posterior (IC95%) a la congelación (40% a 58%), estos bajan significativamente ($p=0,0062$).

Teniendo en cuenta los parámetros Vigor, la muestra se encuentra dentro de los límites establecidos (IC95%) en el momento previo a la congelación (3,46 a 4,24) y posterior a la congelación (1,35 a 2,34), estos reduce significativamente ($p < 0,0001$).

En cuanto a la concentración, la muestra varia (IC95%), ya que los parámetros establecidos en el momento antes de la congelación son (101,14 x 10⁶ a 410,01 x 10⁶).

La muestra de la vitalidad (IC95%) están dentro de los parámetros determinados antes de la congelación (68% a 79%), y después de la congelación (46% a 64%) estas medidas redujeron significativamente ($p=0,0007$).

Las morfo anomalías, se encuentra dentro de las medidas (IC95%), al momento de la congelación (21% a 32%), y posterior a la congelación (36% a 54%), estos valores redujeron notablemente ($p=0,0007$).

En comparación a la integridad de la membrana plasmática, la muestra se encuentra dentro de los parámetros específicos (IC95%) antes de la congelación (25% a 69%), y después de su descongelación (20% a 37%), dichos parámetros descienden significativamente ($p<0,0001$).

Tomando en cuenta la integridad del saco acrosomal (IC95%), la muestra está dentro del rango específico antes de la congelación (70.27 a 102.8), posterior a su congelación (38,78 a 65,3), los valores disminuyeron ($p=0,0014$).

Cuadro 4. Análisis de Varianza Multifactorial entre factores de estudio y calidad espermática.

	MIP	VIGOR	CONCENTRACIÓN	VIABILIDAD	ANORMALIDAD	TEST HOST	IODURO DE PROPIDIO
Raza	0,3144	0,6531	0,569	0,8863	0,8863	0,8034	0,0703
Edad	0,6087	0,9531	0,104	0,3575	0,3575	0,8884	0,0983
Peso	0,5065	0,1895	0,176	0,0955	0,0955	0,0301	0,0763
Color	0,8269	0,9318	0,818	0,8732	0,8732	0,9995	0,9013
Vomito	0,6087	0,4091	0,943	0,8126	0,8126	0,3296	0,2199

En el Cuadro 4, se estudia la varianza multifactorial mediante una prueba de Kruskal y Wallis No paramétrica ($p>0,05$) individual entre factores de estudio (Raza, Edad, Peso, Color y las Observaciones de Signos Clínicos como vomito con las Variables cualitativas espermáticas).

Cada interacción Factor de Estudio (columna) x Variable de Calidad espermática (fila) arroja diferentes valores p, no significativos ($p>0,05$), existiendo únicamente valores de diferencias significativas ($p<0,05$) la siguiente interacción:

Peso x Integridad de la membrana plasmática (Test de Host) ($p=0,0301$); que los de peso Grande ($0,49^a$) seguida del pequeño con un ($0,41^b$) y finalmente el mediano con ($0,35^b$), teniendo en cuenta que le predomina con valores más altos son los perros grandes como se mencionó anteriormente.

Al proceder a analizar las diferentes medidas con los factores de clasificación se pudo observar que únicamente la Profundidad del testículo guarda diferencias significativas ($p=0,06$) en la Raza con $32,50\text{mm}$ ($\pm 5,74$), frente a los Mestizos con $24,73\text{mm}$ ($\pm 5,02$).

Cuadro 5. Relación de la edad y peso con la Calidad espermática

	MIP	VIGOR	CONCENTRACIÓN	VIABILIDAD	ANORMALIDAD	TEST HOST	IODURO DE PROPIDIO
Edad	0,14	0,08	0,33	-0,08	0,00	0,07	0,29
Peso	0,06	0,26	0,30	0,31	0,25	0,24	0,30

En el Cuadro 5 se observa la relación de la edad y el peso con las variables de calidad espermática con una correlación de Spearman, donde la Edad guarda una relación baja con la Concentración y el Test de Ioduro de Propidio; mientras el Peso guarda relaciones más consistentes e igual baja con todas las otras variables a excepción de MIP. Todas las demás relaciones son inexistentes.

V. CAPÍTULO

5. DISCUSIÓN

Se conoce que el tamaño testicular posee una estrecha relación con el volumen de parénquima seminal contenido en la gónada; por su parte, dicho volumen del parénquima seminal tiene relación con la facultad de producir espermatozoides por unidad de tiempo (Illera, 1984). Por lo mismo, Olar et al., (1983) establece que el ancho total del escroto es positivamente útil como profetizador de la capacidad de los perros para producir y eyacular espermatozoides. Además, Woodall & Johnston, (1988) expone que aquellos perros que muestran un índice (calculado por el promedio del largo de ambos testículos y el epidídimo multiplicado por el ancho total del escroto) mayor a 18.00mm, poseen una función de espermatogénesis comparativamente aventajado que los perros que muestren valores del índice menores.

Datos reportados por Cortez et al., (2002) en su investigación, indican índices de circunferencia escrotal del canino, obteniendo una circunferencia escrotal media de $17,6 \pm 1,6$ cm, determinándose una relación de 0,10 ($P > 0,05$) entre la circunferencia escrotal y la concentración espermática, sugiriendo que la concentración del esperma de los perros pastor alemán es independiente de la circunferencia escrotal. Sin embargo, Olar et al., (1983) observan, a diferencia, una alta correlación ($r=0,75$, $P < 0,01$) entre el perímetro escrotal y la eyaculación diaria en perros, lo que nos dice que el perímetro escrotal es aceptable para predecir la producción espermática y de eyaculado.

Por otro , en su estudio, Baratta et al., (2013) revelan una correlación casi inapreciable entre la concentración espermática y el perímetro escrotal en perros de raza Ovejero Alemán.

En los rumiantes menores se ha demostrado que ciertas variables zootécnicas pueden llegar a perjudicar la congelación del seminal. Si bien las causas se desconocen aún, se considera probable que la predisposición oscile por la genética del individuo, línea o raza, puesto que en carneros y cabríos se exponen diferencias relacionadas a estos factores (England, 1993). Si bien las especies son distintas, existen indicios claros de que la genética afecta la calidad espermática, en este aspecto. En este estudio no se pudo profundizar en este aspecto porque no se pudo dar seguimiento al linaje específico de las líneas mestizas y de raza.

La calidad del semen en animales menores a los 6 meses de edad no es tan buena, exponiendo que la morfología, motilidad y concentración mejoran partiendo desde esa edad (Freshman, 2002). Asimismo, se determina que la pubertad en el canino, alcanzado a los 9 meses de edad, puede revelar una mejor calidad espermática (Hewitt et al., 2001). La concentración seminal es inferior en animales que sean mayores a los 4 años de edad, o por su parte, pueden tener un efecto marcado a partir de los 5 años, no obstante, no se revelan significancias o alteraciones en el resto de parámetros seminales (Shalini & Antonie, 2018).

Nöthling, (2005), demuestra diferencias individuales en la calidad seminal después de la congelación, que partieron de animales que en fresco poseían similitudes en los parámetros seminales. Así también, nos declara que las reservas espermáticas del epidídimo pueden verse influenciadas por el tamaño del canino.

Hori, et al., (2006) en su estudio, sostiene que la congelación de espermatozoides caninos se ve afectado fácilmente por la sensibilidad a bajas temperaturas al cual es sometido, en comparación con otras especies. Por lo tanto, la probabilidad de obtener los

resultados requeridos difiere considerablemente, pues refiere comprometer a las células a un estado de estrés térmico que produce un detrimento en la funcionalidad espermática.

Por último, Reyes, (2008), afirma que la susceptibilidad de los espermatozoides se ve estrechamente relacionados con la relación entre ácidos grasos saturados y polinsaturados unidos a los fosfolípidos de la membrana. Se plantea que esta relación es considerablemente baja en caninos, comprometiendo su estructura por sensibilidad al shock térmico.

VI. CAPÍTULO

6. CONCLUSIONES

Los parámetros de motilidad, morfología, integridad de la membrana y concentración espermática, analizados post-congelación se vieron drásticamente reducidos en comparación con los parámetros que se evaluaron previo a la congelación de muestras por efecto de la criopreservación.

Conforme con los parámetros evaluados únicamente el de integridad de la membrana presentó relación directa con el peso de los perros.

Los espermatozoides no demostraron resistencia a los efectos de criopreservación en relación con las características morfométricas de los testículos del perro.

La morfometría testicular de los perros de raza-pequeños, de raza-geriátricos y jóvenes-pequeños, evidenciaron diferencias significativas en comparación con el resto del grupo.

VII. RECOMENDACIONES

- Los resultados declarados nos indican que el grado de inferioridad obtenido tras la congelación puede, si bien ser influenciada por distintos motivos externos, también nos indica la improbabilidad de obtener una muestra espermática viable de los espermatozoides epididimarios del perro al ser sometidos a la criopreservación.
- Llevar a cabo investigaciones con el uso distintivo de crioprotectores como de diluyentes específicos para la especie.
- En toda circunstancia realizar un plan de exploración general clínico y de laboratorio del macho reproductor.
- Estudio a fondo de los efectos externos que puedan provocar una disminución significativa en la calidad espermática en nuestro país.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abarca, A., & Madrigal, M. (2018). Sistemas de análisis computadorizado de semen en la reproducción animal. *Agronomía mesoamericana: organo divulgativo del PCCMCA, Programa Cooperativo Centroamericano de Mejoramiento de Cultivos y Animales*, 469.
- Aguera, S. (2005). *Aparato genital masculino*. Zaragoza: Interamericana McGraw Hill.
- Aiello, S. E. (2000). *El manual de Merck de veterinaria*. Barcelona: Oceano.
- Allen, P. (1998). Allen's fertility and obstetrics in the dog. *Australian Veterinary Journal*, 570.
- Arango-Múnera, J. D.-Z.-R.-D.-G. (2020). *Criopreservación de semen canino (Canis familiaris) en pajilla francesa en el municipio de Medellín, Antioquia*. Obtenido de Revista Colombiana De Ciencia Animal - RECIA, 12(1), e754.: <https://doi.org/10.24188/recia.v12.n1.2020.754>
- Armas, S. (2011). Determinación del tiempo máximo para recuperar y criopreservar espermatozoides obtenidos de la cola del epididimo. *Scielo*, 23-27.
- Arthur, G. (1992). Fertility and Obstetrics in the Dog. *The British Veterinary*, 136-140.
- Batista Arteaga, M., Santana, M., Álamo Santana, D., Cabrera Martín, F., González Valle, F., & Gracia Molina, A. (2013). Refrigeración y congelación seminal en la especie canina: ¿métodos independientes o adicionales? *REVISTA CANARIA DE LAS CIENCIAS VETERINARIAS*, 30.

- Bruce, B. D. (1989). Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 311-316.
- Eilts, B. E., et., W., & al., j. (1993). Ultrasonic measurement of canine testes. *Theriogenology*, 819-828.
- England, C. (1993). Cryopreservation of dog semen: a review. *Supplement*, 243-255.
- Ettinger, S. J., & Feldman, E. C. (2010). *Textbook of veterinary internal medicine: diseases of the dog and the cat*. Estados Unidos: Elsevier Saunders.
- Feldman, E., & Nelson, R. (2007). *Endocrinología y reproducción en perros y gatos*. Philadelphia: WB Saunders.
- Freshman, L. (2002). Semen collection and evaluation. *Clinical Techniques in Small Animal Practice. Elsevier*, 104-107.
- Günzel-Apel, A. R. (1994). *Fertilitätskontrolle und Samenübertragung beim Hund*. Gustav: Hannover.
- Hewitt, A. (2001). Cryopreservation of epididymal dog sperm. *Animal* , 101-111.
- Illera, M. (1984). *Endocrinología Veterinaria y Fisiología de la Reproducción*. Madrid: Imprenta Fareso.
- Jeyendran, R. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*,. *Journal of Reproduction and Fertility*, 219-228.
- Johnston, D., et, R., & al., O. (2008). *Canine and Feline Theriogenology*. Philadelphia: W.B. Saunders.

- Klein, M. (2020). *Fisiología Veterinaria*. Estados Unidos: Elsevier.
- Martínez, F. P. (2006). *Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda*. Estados Unidos: 471-485.
- McDonald, E. (1991). *Endocrinología Veterinaria y Reproducción*. México: Interamericana McGraw-Hill.
- Michelmann, H. W. (2006). Cryopreservation of human embryos. *Cell and Tissue Banking*, 135-141.
- Nöthling, O. (2005). Homologous prostatic fluid added to frozen-thawed dog spermatozoa prior to intravaginal insemination of bitches resulted in better fertility than albumin-free TALP. *Theriogenology*, 975-991.
- Rincón, O. E. (2015). *Determinación del efecto de dos protocolos de criopreservación sobre la viabilidad de la célula espermática canina para la raza pastor belga mallinois*. Obtenido de https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1049&context=maest_ciencias_veterinarias
- Santana, D. (2007). Crioconservación y viabilidad espermática en la especie canina: utilización de nitrógeno líquido vs ultracongelador de-152oC. *Dialnet*, 4-23.
- Shalini, I., & Antonie, D. (2018). Semen characteristics in German shepherd dogs. *Journal*, 2304-2312.
- Simpson, G. (2000). *Fisiología y endocrinología del macho*. España: Manual de Reproducción y Neonatología.

cción animal. *Agronomía Mesoamericana: Organo Divulgativo Del PCCMCA*, Programa Cooperativo Centroamericano de Mejoramiento de Cultivos y Animales, 29(2), 469. <https://doi.org/10.15517/ma.v29i2.30613>.

Aguera, S. (2005). Aparato genital masculino. *Interamericana McGraw Hill*, 969-986.

Aiello, S. E. (2000). *El manual de Merck de veterinaria*. 5ª ed. Barcelona: Océano, 2558.

Allen, P. G. T. (1998). Allen's fertility and obstetrics in the dog. *Australian Veterinary Journal*, 76(8). <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1998.tb10222.x>

Andersen, K. (1975). Insemination with frozen dog semen based on a new insemination technique. *Reproduction in Domestic Animals*, 10(1), 1–4. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0531.1975.TB00275.X>

Armas, S., Fernández, V., Vásquez M., & Santiani A. (2011). Determinación del tiempo máximo para recuperar y criopreservar espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo en caninos post orquiectomía. *Scielo.Org.Pe*, 22(3), 23–27. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172011000300004

Arthur, G. H. (1992). Fertility and obstetrics in the dog. *The British Veterinary Journal*, 148(5), 136-140. [https://doi.org/10.1016/0007-1935\(92\)90037-2](https://doi.org/10.1016/0007-1935(92)90037-2)

Ávila-Portillo, L. M., Madero, J. I., López, C., León, M. F., Acosta, L., Gómez, C., Delgado, L. G., Gómez, C., Lozano, J. M., & Reguero, M. T. (2006). Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 57(4), 291–300. <https://doi.org/10.18597/RCOG.468>

Bailey, T., Monke, D., Hudson, R., Wolfe, D., *Theriogenology*, (1996). Testicular shape and its relationship to sperm production in mature Holstein bulls. *PubMed*, 46(5), 881–889. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X96002452>

Belda, R., Nerin, O., & Marcos, R. (2021). Infertilidad en el macho canino. Infertility in the male dog. *Zaguan.unizar.es*. <https://zaguan.unizar.es/record/106986/files/TAZ-TFG-2021-1606>. <https://zaguan.unizar.es/record/106986/files/TAZ-TFG-2021-1606.pdf>

Betancur, G. R., Oquendo, O. G., & Aranque, N. V. (2011). Criopreservación de semen canino por congelación rápida con glicerol y Dimetilformamida. *Scielo.Org.Co*, 8(2), 127–136. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-44492011000200002

Betancur, G. R., Vásquez Araque, N., & Garcia, E. A. (2009). Criopreservación de semen canino y su aplicación en la inseminación artificial. *Dialnet.Unirioja*, 4(2), 119–129. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8392340>

Lino B. F. (1972). The output of spermatozoa in rams II. Relationship to scrotal circumference, testis weight, and the number of spermatozoa in different parts of the urogenital tract. *Australian Journal of Biological Sciences*, 25(2), 359–366. <https://www.publish.csiro.au/BI/BI9720359>

Cabrera, P., & Fernández, A. (2006). Criopreservación de Embriones: una herramienta básica en la Reproducción Asistida. *Redalyc.Org*, 47(2), 59–69. <https://www.redalyc.org/pdf/3731/373139066001.pdf>

Cárdenas, J. R. (2013). Evaluación de dos agentes crioprotectores no permeables y un diluyente comercial (triladyl) en la congelación de semen bovino. *Universidad de*

Cuenca,

4–17.

https://www.lareferencia.info/vufind/Record/EC_e4077883c46d65ba59d8197f9bed3561

Cardoso, R. C., Silva, A. R., Uchoa, D. C., & Silva, L. M. (2003). Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations. *Elsevier*, *59*(4), 743–751.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X02011512>

Cartee, R., Gray, B., Powe, T., Theriogenology, (1989). Preliminary implications of B-mode ultrasonography of the testicles of beef bulls with normal breeding soundness examinations. *Elsevier*, *31*(6), 1149–1157.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0093691X89900836>

Caturla-Sánchez, E., Sánchez-Calabuig, M. J., Pérez-Gutiérrez, J. F., Cerdeira, J., Castaño, C., & Santiago-Moreno, J. (2018). Vitrification of dog spermatozoa: Effects of two cryoprotectants (sucrose or trehalose) and two warming procedures. *Cryobiology*, *80*, 126–129. <https://doi.org/10.1016/J.CRYOBIOL.2017.11.001>

Chirinéa, H. V., Martins, M. I. M., Ferreira de Souza, F., Tebet, M. J., Papa, F. O., & Lopes, M. D. (2006). Características morfofuncionais do sêmen canino refrigerado e congelado, usando dois diferentes meios diluentes. *Revistas.Ufg.Br*, *7*(4), 407–415.

<https://www.revistas.ufg.br/vet/article/view/870>

Condoy, M. C., & Cevallos, J. C. (2017). Diluyentes utilizados en inseminación artificial porcina. *Redalyc.Org*, *18*(9), 3–11.

<https://www.redalyc.org/pdf/636/63653009012.pdf>

Cortez, A., Aquino-Cortez, A. (2002). Relationship between scrotal circumference and spermatic concentration in normal clinical German Shepherd dogs. *SciELO Brasil*,

54(5), 549–550. from
<https://www.scielo.br/j/abmvz/a/YRbZvNyDJm9tYSwTSnmhzNw/abstract/?lang=en&format=html>

Coulter, G., Theriogenology, D. B. (1988). Effects of ultrasonography on the bovine testis and semen quality. *Elsevier*, 30(4), 743–749.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0093691X88903093>

Díaz, D. J. (2015). Desarrollo de diluyentes de baja complejidad y costo para la preservación a corto y mediano plazo de semen canino. *Universidad Nacional de la Plata*, 15–50. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/50000>

England, G. C. (1993). Cryopreservation of dog semen: a review. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 47, 243–255.

Eugenia M., & Baratta, E. K. (2013). Utilización de mediciones testiculares y evaluación seminal estacional en perros Ovejero Alemán. *Universidad de la Republica*, 8–27. <https://bibliotecadigital.fvet.edu.uy/handle/123456789/2194>

Eilts, B. E., Williams, D. B., & Moser, E. B. (1993). Ultrasonic measurement of canine testes. *Theriogenology*, 40(4), 819–828. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(93\)90217-s](https://doi.org/10.1016/0093-691x(93)90217-s)

Ettinger, S. J., & Feldman, E. C. (2010). *Textbook of veterinary internal medicine: diseases of the dog and the cat*. Elsevier Saunders.

Feldman, E. C., & Nelson, R. W. (2007). Endocrinología y reproducción en perros y gatos (3ra edición), Ed. *WB Saunders, Philadelphia*, 399-480.
http://www.intermedica.com.ar/media/mconnect_uploadfiles/f/e/feldman.pdf

Futino, D. O. (2008). Uso do glicerol, metil-formamida e dimetil-formamida como crioprotectores do sêmen canino. *ResearchGate*, 25–40. <https://repositorio.unb.br/handle/10482/1746>

Freshman, J. L. (2002). Semen collection and evaluation. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 17(3), 104–107. <https://doi.org/10.1053/svms.2002.34326>

Günzel-Apel, A. R. (1994). *Fertilitätskontrolle und Samenübertragung beim Hund*. Urban & Fischer in Elsevier, 115.

Guanga, L. A., Peña, G. G., Alemán, F. C., Carpio, R. R., Escandón, P. N., & Ortiz, G. C. (2019). Centrifugación coloidal como método de selección espermática previo a la crioconservación con glicerol en caninos. *Producción Animal*, 31(1), 326–330. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-79202019000100037

Hermansson, U., & Linde Forsberg, C. (2006). Freezing of stored, chilled dog spermatozoa. *Theriogenology*, 65(3), 584–593. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.06.004>

Hernández, C. L. B., & Mejía, R. B. (2007). Evaluación de la capacidad fecundante del semen canino congelado, comparando glicerol, etilenglicol y DMSO como crioprotectores en el diluyente tris glucosa. *Ciencia Unisalle*, 6–13. https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina_veterinaria/349/

Hernandez, D., & Gonzalez, D. C. (2015). Aplicación del Test Hipoosmótico (host) en la evaluación de calidad seminal en ovinos criollos de pelo colombiano. *DocPlayer*, 6, 166–170. <https://docplayer.es/8284962-Aplicacion-del-test-hipoosmotico-host-en-la-evaluacion-de-calidad-seminal-en-ovinos-criollos-de-pelo-colombiano.html>

Hewitt, D. A., Leahy, R., Sheldon, I. M., & England, G. C. (2001). Cryopreservation of epididymal dog sperm. *Animal Reproduction Science*, 67(1–2), 101–111. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(01\)00090-2](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(01)00090-2)

Hezavehei, M., Sharafi, M., Kouchesfahani, H. M., Henkel, R., Agarwal, A., Esmaeili, V., & Shahverdi, A. (2018). Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Elsevier*, 37(3), 327–339. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.05.012>

Hori, T., Odaka, S., Oba, H., Mizutani, T., Kawakami, E., & Tsutsui, T. (2006). Effects of liquid nitrogen vapor sensitization conditions on the quality of frozen-thawed dog spermatozoa. *Jstage.Jst.Go.Jp*, 68(10), 1055–1061. https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/68/10/68_10_1055/_article/-char/ja/

Illera, M. M. (1984). *Endocrinología Veterinaria y Fisiología de la Reproducción. Imprenta Fareso*, 209-315.

Jeyendran, R. S., Van der Ven, H. H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B. G., & Zaneveld, L. J. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*, 70(1), 219–228. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0700219>

Johnston, S. D., Root-Kustritz, M. V., & Olson, P. N. S. (2008). *Canine and Feline Theriogenology*. W B Saunders, 592.

Klein, B. G. (2020). *Cunningham. Fisiologia Veterinaria* (6th ed.). Elsevier, 576. https://www.academia.edu/38688793/FISIOLOG%C3%8DA_VETERINARIA

Lara, A. de la, Hesser, A., Christensen B., Gonzales K., & Meyers S. (2019). Effects from aging on semen quality of fresh and cryopreserved semen in Labrador

Retrievers.

Elsevier, 132,164–171.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X18304370>

López, J. (2020). *Anatomía clínica del perro y gato*.

<https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=VkvSDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA87&dq=anatomia+clinica+del+perro+y+el+gato&ots=VG7dUrzeKe&sig=ir40uF0KzVjqNSHyJOX6YrWQHEM>

Martínez, F. P., Marcias, V. G., Álvares, M., & Chamorro, C. (2006). Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. *Theriogenology*, 471-485.

McDonald, E. (1991). Endocrinología veterinaria y reproducción. *Interamericana-McGraw-Hill*, 448-473. <https://doi.org/968-25-1641-2>

Montesdeoca, P. E. P. (2019). Evaluacion de la adiccion de yema de huevo y crema de leche al diluyente, para la criopreservacion del semen canino. *Universidad Técnica de Cotopaxi*, 15-30. <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/5987>

Morton, D. B., & Bruce, S. G. (1989). Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 39, 311–316.

Nöthling, J. O., Shuttleworth, R., de Haas, K., & Thompson, P. N. (2005). Homologous prostatic fluid added to frozen-thawed dog spermatozoa prior to intravaginal insemination of bitches resulted in better fertility than albumin-free TALP. *Theriogenology*, 64(4), 975–991.

Olar, T., Amann, R. (1983). Relationships among testicular size, daily production and output of spermatozoa, and extragonadal spermatozoal reserves of the dog.

Academic.Oup.Com, 29, 1114-1120. From <https://academic.oup.com/biolreprod/article-abstract/29/5/1114/2766414>

Pesch, S. (2007). Cryopreservation of spermatozoa in veterinary medicine. *Researchgate.Net*, 4(2), 101–105. https://www.researchgate.net/profile/Bernd-Hoffmann/publication/279502789_Cryopreservation_of_Spermatozoa_in_Veterinary_Medicine/links/5a770d33a6fdccb3c097d94/Cryopreservation-of-Spermatozoa-in-Veterinary-Medicine.pdf

Prapaiwan, N., Tharasanit, T., Punjachaipornpol, S., Yamtang, D., Roongsitthichai, A., Moonarmart, W., Kaeoket, K., & Manee-in, S. (2016). Low-density lipoprotein improves motility and plasma membrane integrity of cryopreserved canine epididymal spermatozoa. *Ncbi.Nlm.Nih.Gov*, 29(5), 29–5. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4852225/>

Restrepo, G. V, Madrid, C. R., Prieto, L. R., Duque, E. D., & Usuga, A. S. (2017). Congelación de semen epididimal canino con yema de huevo centrifugada. *Scielo.Org.Pe*, 28(4), 40–53. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1609-91172017000400012&script=sci_arttext&tlng=en

Reyes, M. (2008). *Espermatozoides caninos congelados: ¿por qué son tan débiles?*. *TecnoVet*. <https://tecnovet.uchile.cl/index.php/RT/article/view/39093>

Ribeiro-Peres, A., Munita-Barbosa, L., Yumi-Kanazawa, M., Mello-Martins, M. I., & Ferreira De Souza, F. (2014). Criopreservación de espermatozoides bovinos extraídos de la cola del epidídimo utilizando los métodos convencional y automatizado. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 46(1), 31–38. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2014000100005>

Robles, V. M. M., Santamaría, Y. M. V., & Casallas, P. E. C. (2005). Aspectos generales de la crioconservación espermática en peces teleósteos. *Scielo.Org.Co*, 18(1), 35–45. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-06902005000100005

Rodrigues, C. (2009). Evaluación de la actividad enzimática de acrosina durante la capacitación de espermatozoides congelados de perro. *FLAUC*, 15–27. <http://flauc-openaccess.urosario.edu.co/vufind/Record/oai:repositorio.uchile.cl:2250-131176>

Rodríguez, A. A., Gonzales, J. A. S., Vargas, A. K. V., & Herrera, J. A. B. (2018). Recolección y manipulación seminal in vitro. Universidad Autónoma Metropolitana, 9–36. https://www.casadelibrosabiertos.uam.mx/contenido/contenido/Libroelectronico/recoleccion_manipulacion.pdf

Root-Kustritz, M. V. (2011). Clinical canine and feline reproduction. *Evidence-based answers*. John Wiley & Sons.

Salazar, D. S. M., Ortiz, I. P. Y., & Bolaños, R. F. D. (2020). Protocolos de inseminación artificial a tiempo fijo con diferentes inductores de la ovulación en vacas criollas. *Revista Ecuatoriana de Ciencia Animal*, 4(3), 63–70. <http://revistaecuatorianadecienciaanimal.com/index.php/RECA/article/view/234/186>

Salinas, P., Pezo, F., Sánchez, R., & Risopatrón, J. (2014). Validación de SYBR-14 y 6-CFDA para evaluar la viabilidad e integridad de la membrana plasmática en espermatozoides caninos de raza Chihuahua. *SciELO Chile*, 32(1), 16–21. https://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-95022014000100003&script=sci_arttext

Sanchez, A., Rubilar, J., & Gatica, R. (2002). Uso de la prueba hipoosmótica en la evaluación de la fertilidad potencial de semen canino fresco y congelado. *Archivos de*

Medicina Veterinaria, 34(1), 131–134. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2002000100014>

Santana, D. A. (2007). Crioconservación y viabilidad espermática en la especie canina: utilización de nitrógeno líquido vs ultracongelador de -152°C. *Dialnet*, 4–23. <https://accedacris.ulpgc.es/bitstream/10553/1910/1/3031.pdf>

Santana, M. C. (2012). Efecto de variantes aplicadas a los procedimientos tecnológicos en la conservación seminal de la especie canina. *MVIT*. https://accedacris.ulpgc.es/bitstream/10553/7148/4/0658471_00000_0000.pdf

Santos, J. G., Tadeo, R. J., Camarillo, C. O., Olivares, Á. T., Onofre, M. V., & Rodríguez, A. A. (2015). Criopreservación de espermatozoides epididimales a diferentes tiempos postmortem en caninos. *Scielo.Sld.Cu*, 35(2), 15–20. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2013000200010

Shalini, I., & Antoine, D. (2018). Semen characteristics in German shepherd dogs. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(03), 2304–2312. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.703.270>

Silva, A. R. (2007). Atualidades sobre a criopreservação do sêmen de cães. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 31(1), 119–127. www.cbra.org.br.

Simpson. (2000). Manual de Reproducción Y Neonatología En Pequeños Animales. *Elsevier Espana*, 79-90.

Stornelli, M., & Sota, R. (2007). Fertilidad y supervivencia del semen canino criopreservado. *Sedici.Unlp.Edu.Ar*, 25(2), 30–35. http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/11194/Documento_completo___pdf?sequence=1

Thompson, J. (1995). Scrotal size of yearling sires and early calving in beef herds: Epidemiological investigation of possible causal pathways. *Elsevier*, 43(7), 1279–1287. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0093691X9500099T>

Ugur, M. R., Saber Abdelrahman, A., Evans, H. C., Gilmore, A. A., Hitit, M., Arifiantini, R. I., Purwantara, B., Kaya, A., & Memili, E. (2019). Advances in Cryopreservation of Bull Sperm. *Frontiers in Veterinary Science*, 6, 224–230. <https://doi.org/10.3389/FVETS.2019.00268/FULL>

Uribe Valderrama, R., María, ;, Arango Rodríguez, E., Rendón Álvarez, L., Carlos, M. ;, & Naranjo, M. A. (2011). Evaluation of canine semen that has gone through a freezing and thawing process with different glycerol concentrations as a crioprotector*/Evaluación del. *Revistas.Ces.Edu.Co*, 6(1), 21–30. <https://revistas.ces.edu.co/index.php/mvz/article/download/1490/1925/0>

Varesi, S., Gaia, C., & Cremonesi, L. F. (2013). Espermatozoides del epidídimo canino: características, recolección y criopreservación. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 4(2), 119–129. <https://air.unimi.it/handle/2434/219126>

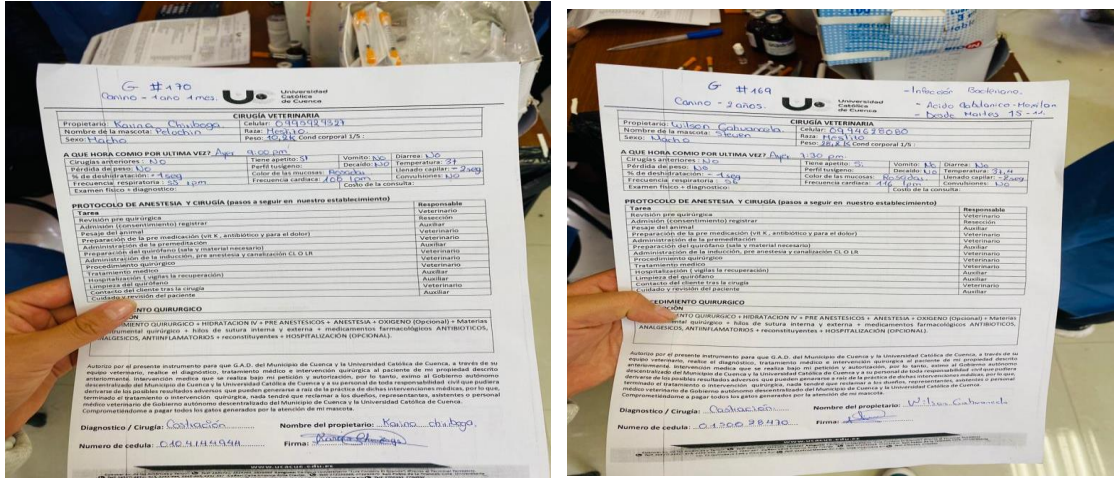
Vásquez, F., & Echeverri, V. D. (2007). Espermograma y su utilidad clínica. *Scielo.Org.Co*, 33(2), 12–17. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-55522007000200009

Whittingham, D. G., Leibo, S. P., & Mazur, P. (1972). Survival of mouse embryos frozen to -196° and -269°C . *Science*, 178(4059), 411–414. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.178.4059.411>

Woodall, P. F., & Johnstone, I. P. (1988). Scrotal width as an index of testicular size in dogs and its relationship to body size. *Journal of Small Animal Practice*, 29(8), 543–547. <https://doi.org/10.1111/J.1748-5827.1988.TB02306.X>

IX. ANEXOS

Anexo 1. Toma de datos de los perros



Anexo 2. Cirugía de orquiectomía



Anexo 3. Análisis morfométrico



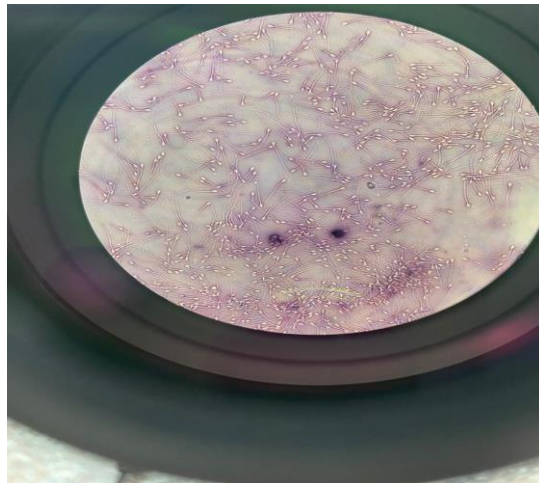
Anexo 4. Recuperación de espermatozoides por el método de flujo retrogrado



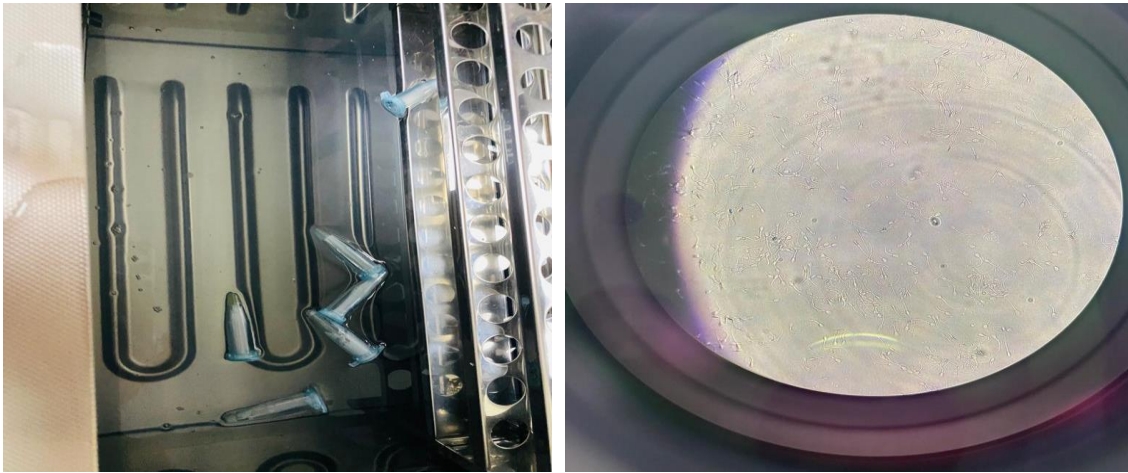
Anexo 5. Refrigeración y congelación de los espermatozoides



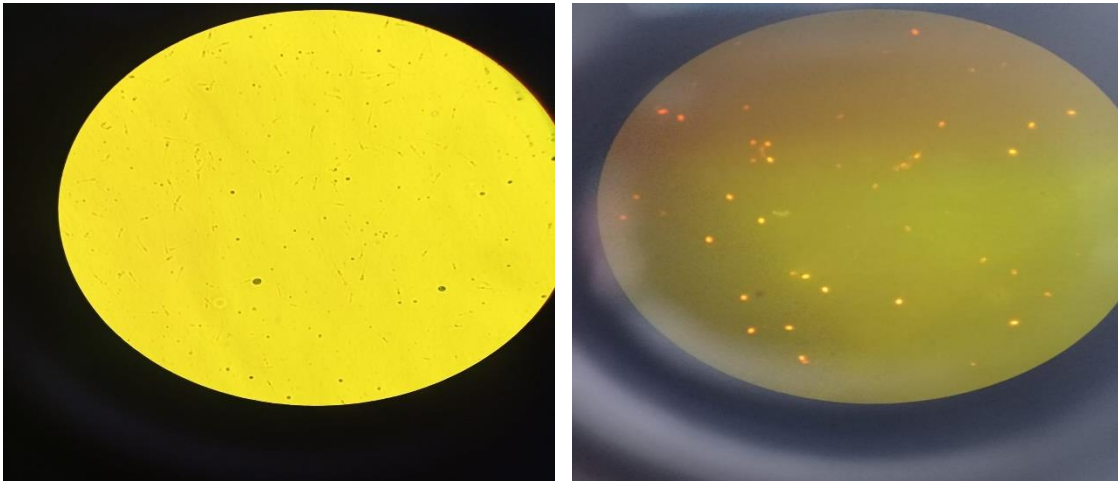
Anexo 6. Test de eosina-nigrosina



Anexo 7. Test de HOST



Anexo 8. Test de Ioduro de propidio





Ivana Sofia Verdugo Morales portador(a) de la cédula de ciudadanía N° **1729159523** y **Daniela Estefania Villacis Cabrera** portador(a) de la cédula de ciudadanía N° **0105744981**. En calidad de autoras y titulares de los derechos patrimoniales del trabajo de titulación “**RELACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS CORPORALES Y MORFOMETRÍA TESTICULAR EN LA CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMARIOS CANINOS**” de conformidad a lo establecido en el artículo 114 Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, reconocemos a favor de la Universidad Católica de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos y no comerciales. Autorizamos además a la Universidad Católica de Cuenca, para que realice la publicación de éste trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, **5 de Mayo de 2023**

Ivana Sofia Verdugo Morales

C.I. 1729159523

Daniela Estefania Villacis Cabrera

C.I. 0105744981