



**UNIVERSIDAD ALAS PERUANAS**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA**

**TESIS**

**EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DEL GLICEROL COMO CRIOPROTECTOR  
SOBRE LA CALIDAD DE SEMEN CANINO (*Canis familiaris*)**

**PACHACAMAC UAP 2016**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO**

**KARINA QUINTANA ÁLVAREZ**

**BACHILLER EN MEDICINA VETERINARIA**

**LIMA – PERÚ**

**2016**

## i DEDICATORIA

A Dios, por darme la fuerza  
y perseverancia para seguir adelante.

A mi madre, por ser el motor de  
Mi vida diaria y mi inspiración.

A mis hermanos, que con su ejemplo  
Me motivan a ser mejor persona y  
Profesional.

A mi hija Luciana, que ha logrado sacar  
Lo mejor de mí y demostrarme que todo es  
posible si uno se lo propone.

A mi amado esposo Samuel, por su apoyo  
en el desarrollo de esta tesis.

## ii AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento infinito a mi asesor de tesis Francisco Rodríguez Gavancho, M.V;M Sc. por haberme permitido compartir estos largos meses de aprendizaje y brindarme de manera desinteresada todos sus conocimientos; orientándome con mucha paciencia y dándome confianza para lograr el objetivo que me trace al iniciar este proyecto, que hoy se ve reflejada en la tesis para la obtención de mi título profesional. A la Universidad Alas Peruanas por permitirme el uso del laboratorio central, equipos y reactivos necesarios para el desarrollo de esta investigación. A cada uno de mis docentes, desde el primer hasta el décimo ciclo, por todos los conocimientos brindados durante mi formación académica. Hago mención especial a la M.V; M. Sc. Juana Zavaleta Luján que me facilitó equipos y pacientes y al M.V; M. Sc. Hugo Beltrán Samamé por brindarme su valioso tiempo, para absolver todas mis dudas sobre estadística. A mis queridas tías Adela y Rosa que me brindaron su apoyo durante mis horas de ausencia en casa, siendo así ellas, una madre para mi amada hija. A mis queridos hermanos Crisalida, Etato, Ulises, Marcial, Alberto, Sofía, por ser mi soporte familiar en cada etapa de mi vida. A mi hermana Yesika por ser ella la impulsadora para estudiar mi segunda carrera y motivarme a seguir creciendo día a día como persona y profesional. A mi esposo Samuel Quispe; porque él estuvo a mi lado desde que inicié mi tesis hasta culminarlo; dejando postergando muchos proyectos personales, para permitirme lograr el mio. A mi linda madre Julia Álvarez, que con paciencia y cariño, a pesar de la distancia, me dio palabras de aliento para continuar.

## ii RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo determinar la influencia de 3 concentraciones de glicerol como crioprotector, sobre la calidad de semen canino. Para esto se aplicó el estudio pre experimental con pre y post prueba. Se trabajó con 4 caninos de diferentes razas de 2 a 5 años de edad, de los cuales se obtuvo un total de 12 eyaculados; un eyaculado por canino cada semana durante 3 semanas. Sólo se trabajó con 8 eyaculados ya que los 4 primeros fueron para la prueba control. A estos 8 eyaculados se les sometió a las tres concentraciones de glicerol (4, 5 y 6%); obteniéndose un total de 96 muestras empacadas en pajuelas de 0.25 ml cada uno, distribuidos en 4 grupos con cuatro repeticiones para cada concentración de glicerol. Para determinar la calidad de semen canino post descongelamiento se empleó la técnica espermiograma convencional. Se logró determinar que hay diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los 3 tratamientos; con una tendencia que favorece al tratamiento 2 (glicerol al 5%) ya que tuvo un porcentaje mayor de espermatozoides viables y membrana funcional intacta a la prueba con motilidad progresiva con un  $x \pm IC$   $87.5 \pm 4.98$ , concentración espermática con un  $x \pm IC$   $172.43 \pm 5.64$ , tinción de eosina - nigrosina con un  $x \pm IC$   $150.06 \pm 6.88$  y al test hiposmótico con un  $x \pm IC$   $158.06 \pm 7.14$ . Se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos 1 y 3 (glicerol al 4% y 6% respectivamente) a la prueba con motilidad progresiva con un  $x \pm IC$  ( $75 \pm 4.98$ ;  $42.5 \pm 4.98$ ), concentración espermática con un  $x \pm IC$  ( $114 \pm 5.64$ ;  $89.25 \pm 5.64$ ), tinción de eosina - nigrosina con un  $x \pm IC$  ( $93.56 \pm 6.88$ ;  $66.56 \pm 6.88$ ) y al test hiposmótico con un  $x \pm IC$  ( $131.12 \pm 7.14$ ;  $84.5 \pm 7.14$ ) respectivamente. Los resultados obtenidos permiten concluir, que la utilización de estos 3 tratamientos evaluados y la prueba control en la presente investigación, proporcionó efectos variables, siendo el mejor, la concentración del glicerol al 5%. Por lo que se sugiere crioconservar semen canino con la concentración del 5% para mejores resultados, descartando así la concentración del 4% y 6% de glicerol.

Palabras claves: Espermatozoides, Hidroximetil-aminometano, congelación, Dimetilsulfoxido

#### iv ABSTRACT

The present investigation had as objective to determine the influence of 3 concentrations of glycerol as cryoprotector, on the quality of canine semen. For this the pre-experimental study with pre and post test was applied. We worked with 4 canines of different races from 2 to 5 years of age, from which a total of 12 ejaculates were obtained; One ejaculate per canine each week for 3 weeks. We only worked with 8 ejaculates since the first 4 were for the control test. These 8 ejaculates were subjected to the three concentrations of glycerol (4, 5 and 6%); Obtaining a total of 96 samples packed in straws of 0.25 ml each, distributed in 4 groups with four replicates for each concentration of glycerol. To determine the quality of canine semen after thawing, the conventional spermogram technique was used. It was possible to determine that there were significant differences ( $p < 0.05$ ) among the 3 treatments; With a tendency that favors treatment 2 (5% glycerol) as it had a higher percentage of viable spermatozoa and an intact functional membrane to the test with progressive motility with an  $x \pm IC$   $87.5 \pm 4.98$ , spermatic concentration with an  $x \pm IC$   $172.43 \pm 5.64$ , eosin - nigrosin staining with  $x \pm CI$   $150.06 \pm 6.88$  and the hyposmotic test with an  $x \pm CI$   $158.06 \pm 7.14$ . Significant differences ( $p < 0.05$ ) between treatments 1 and 3 (4% and 6% glycerol, respectively) were observed for the progressive motile test with  $x \pm IC$  ( $75 \pm 4.98$ ,  $42.5 \pm 4.98$ ), sperm concentration ( $93 \pm 5.64$ ,  $89.25 \pm 5.64$ ), eosin - nigrosin staining with  $x \pm IC$  ( $93.56 \pm 6.88$ ,  $66.56 \pm 6.88$ ) and hyposmotic test with  $x \pm CI$  ( $131.12 \pm 7.14$ ,  $84.5 \pm 7.14$ ) respectively. The results obtained allow us to conclude that the use of these 3 treatments evaluated and the control test in the present investigation provided variable effects, the best being the concentration of glycerol at 5%. Therefore it is suggested to cryopreserve canine semen with the concentration of 5% for better results, thus discarding the concentration of 4% and 6% of glycerol.

Key words: Spermatozoa, Hydroxymethyl aminomethane, freezing, Dimethylsulfoxide

# ÍNDICE

	Página
Contenido	
i. DEDICATORIA	
ii. AGRADECIMIENTO	
iii. RESUMEN	
iv. ABSTRACT	
I. INTRODUCCIÓN	9
II. MARCO TEÓRICO	
2.1. Antecedentes	10
2.2. Crioconservación	14
2.2.1. Etapas del proceso de crioconservación	14
2.2.2. Factores determinantes de la crioconservación	18
2.2.3. Agentes crioprotectores	18
2.2.4. Clasificación de los crioprotectores	19
a. Glicerol	20
b. Dimetilsulfoxido	21
c. Etilenglicol	21
2.3 Diluyentes de semen canino	22
2.3.1. Tipos de diluyentes	23
a. Hidroximetil -aminometano	23
b. Yema de huevo	23
2.4. Calidad de semen canino	24
2.4.1. Semen canino	24
2.4.1.1. El proceso de espermatogénesis	25
2.4.1.2. Capacitación de los espermatozoides	25
2.4.2. Características del semen canino	25
2.4.3. Partes del semen canino	26

2.4.4. Criterios para la evaluación del semen canino	27
--	----

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Espacio y tiempo	32
3.2. Población y muestra	33
3.3. Diseño de investigación	34
3.4. Equipos y procedimiento	34
3.4.1. Equipos	34
3.4.2. Procedimiento	35
3.4.2.1. Obtención de semen	35
3.4.2.2. Evaluación seminal	36
a. Espermiograma convencional	36
3.4.2.3. Congelación de semen canino	39
a. Preparación de dilutor madre	39
b. Preparación de dilutor glicerinado	39
c. Preparación de muestra de semen con cada concentración de glicerol	40
d. Criopreservación de semen canino	41
3.4.2.4. Evaluación del semen post descongelamiento	41
3.5. Diseño estadístico	
3.5.1. Estadística descriptiva	42
3.5.2. Análisis descriptivo	42

IV. RESULTADOS	43
----------------	----

V. DISCUSIÓN	52
--------------	----

VI. CONCLUSIONES	56
------------------	----

VII. RECOMENDACIONES	57
----------------------	----

VIII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
IX. ANEXOS	68



## I. INTRODUCCION

Con el avance de la tecnología se ha presentado un creciente interés por el área de reproducción en caninos. El uso de la inseminación artificial se ha incrementado considerablemente, usándose especialmente el semen criopreservado, ya que brinda diferentes opciones como el cruzar el material genético en todo el mundo sin la necesidad física del animal, sobrepasar el efecto de la edad e incluso la vida del individuo, la preservación de los genes en el banco de semen y el aumento de la variabilidad genética.

El poder realizar un análisis adecuado de las diferentes concentraciones de glicerol como crioprotector de semen canino, nos permite mantener la capacidad fertilizante del mismo, así como brindar información más profunda en el área de la biotecnología de la reproducción de pequeños animales y además, en un futuro se podrá llevar a cabo la utilización de estos para mejorar los alcances reproductivos en nuestro país, ya que se busca aportar conocimientos que guíen a una mejor preparación y análisis de la criopreservación de semen canino.

EL siguiente trabajo de investigación pretende determinar cuál de las concentraciones de glicerol, mantiene de mejor forma las características y viabilidad de los espermatozoides caninos, realizando un análisis del semen previa crioconservación y post prueba, evaluando además, todos los parámetros de funcionalidad espermática y así permitir la utilización y aumento del potencial y rendimiento reproductivo.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes

Uribe R y colaboradores (1) en la investigación “Evaluación del semen canino, sometido a congelación con diferentes concentraciones de glicerol como crioprotector” tuvo como propósito evaluar el efecto de tres diferentes concentraciones de glicerol sobre el semen canino sometido a procesos de criopreservación. El método usado para recolectar semen canino fue por medio de manipulación manual, obteniéndose 12 muestras seminales de machos de la raza labrador, clínicamente sanos y sometidos a las mismas condiciones de manejo. Cada muestra se dividió en cuatro tratamientos (T1: control, T2: 4%, T3: 6% y T4: 8% de glicerol); a los cuales se les evaluó el volumen, pH, movilidad, concentración, morfología y vitalidad, respectivamente. En el análisis pos descongelación determinaron las diferencias seminales y se estableció su relación con la concentración del crioprotector. Los resultados obtenidos en este proyecto mostraron diferencias significativas entre las variables morfología, mortalidad y concentración; igualmente se estableció que los tratamientos T2 (4% de glicerol) y T3 (6% de glicerol) presentaron mejores resultados para la congelación de semen en caninos.

Corti GL (2) en la tesis “Evaluación de la capacidad fecundante del semen congelado de perro (*Canis Familiaris*), en ova recuperadas de perras en celo inducido” con el propósito de evaluar la capacidad fecundante del semen congelado de perro, en ovas recuperadas de perras en celo inducido, se seleccionaron 6 eyaculados, provenientes de 2 perros de fertilidad probada, y 6 perras, en estado de anestro, evidenciado mediante citología vaginal.

El método usado para evaluar los eyaculados fue a través de un espermiograma convencional, y posteriormente congelados, en pajuelas de 0,5 ml utilizando como

diluyente TRIS-Fruktosaácido cítrico, 20% de yema de huevo, 8% de glicerol. Una vez almacenadas en nitrógeno líquido las muestras fueron descongeladas para ser evaluadas a través de la motilidad espermática. Los resultados obtenidos permiten concluir que es posible la congelación de semen de perro y obtener buenos resultados de motilidad después de congelado, previa selección de los eyaculados, así como que es posible inducir celos fértiles con el tratamiento utilizado y lograr fecundación de las ova con semen congelado, mediante inseminación artificial intravaginal, con un porcentaje superior al 50% y que puede alcanzar hasta el 90%.

Restrepo BG (3) en la investigación “Criopreservación de semen canino por congelación rápida con glicerol y dimetilformamida” con el objetivo de comparar el efecto de la congelación rápida con glicerol y Dimetilformamida sobre la calidad post-descongelación del semen canino se usó el método de criopreservación por congelación rápida, para ello fueron implementados cuatro tratamientos (glicerol al 3% y 5%, y Dimetilformamida al 3% y 5%). Posterior a la descongelación, fueron evaluados para cada tratamiento, la movilidad individual, la morfología espermática y la integridad de membrana de los espermatozoides. En los resultados obtenidos para la movilidad individual se encontró superioridad del glicerol 5% sobre DMF 5%, glicerol 3%, y DMF 3%. Para la integridad de membrana, DMF 5% obtuvo el mayor promedio siendo superior a glicerol 3% y DMF 3%, pero sin diferencia estadística sobre glicerol 5%. Para la morfología espermática no se encontró diferencia estadística entre glicerol 5%, glicerol 3% y DMF 5% pero sí hubo diferencia entre estos y DMF 3%, por lo tanto se concluye que el glicerol y la DMF en concentraciones del 5% proveen una protección similar del semen canino durante la criopreservación por congelación rápida.

Carlotto RG (4) en la tesis “Efecto del momento de adición del glicerol durante la curva de enfriamiento sobre la calidad espermática durante el proceso de criopreservación de semen canino” con el objetivo de evaluar el efecto del momento de adición del glicerol durante la curva de enfriamiento sobre la calidad espermática del semen canino utilizó 15 eyaculados de 4 perros adultos. Cada muestra de semen fue sometida a 3 métodos de adición del glicerol los cuales se diferenciaron por la concentración de glicerol presente en el dilutor durante la curva de enfriamiento. Finalizada la curva de enfriamiento el semen se envaso en pajillas de 0.5 mL para proceder al congelamiento en nitrógeno líquido. La motilidad progresiva y la integridad funcional de membrana fueron los parámetros utilizados para evaluar la calidad seminal al descongelamiento. Los resultados obtenidos en esta tesis no se encontró diferencia estadística entre ninguno de los 3 métodos de adición del glicerol. Por lo tanto se concluye que el momento de adición del glicerol no influye de manera diferencial sobre la motilidad progresiva y la integridad funcional de membrana pudiéndose gracias a esto simplificar el proceso de criopreservación al añadir el glicerol al inicio de la curva de enfriamiento pues ya no se manipularía el semen hasta el envasado.

Bonilla HC y Ballesteros MR (5) en la tesis “Evaluación de la capacidad fecundante del semen canino congelado, comparando glicerol, etilenglicol y DMSO como crioprotectores en el diluyente tris-glucosa-yema de huevo” con el objetivo de realizar pruebas con 3 crioprotectores diferentes para observar de manera más detallada su acción protectora sobre el espermatozoide y así poder establecer cuál de estas moléculas lo protegía aun más de la crioinjuria a la cual se ve sometido el espermatozoide en el momento de la congelación de semen. Para ello se emplearon 3 perros de diferentes razas para la posterior obtención de semen para su congelación. El método usado para evaluar los eyaculados fue a través de un espermiograma convencional.

Posteriormente se consiguieron 15 perras de gran variabilidad en cuanto a razas y tamaños las cuales fueron inseminadas con el semen obtenido anteriormente para ser valoradas a los 25 días pos inseminación por medio de ecografía diagnosticando preñez positiva o negativa; así se valoró la capacidad fecundante del semen congelado evaluado con tres crioprotectores diferentes diluidos en un mismo medio. Los resultados obtenidos arrojaron que hay diferencias significativas en la evaluación microscópica entre las moléculas crioprotectoras (Glicerol, Etilenglicol, DMSO), y se puede concluir que es el Etilenglicol la molécula crioprotectora que mejor protege al espermatozoide de los daños ocasionados por la congelación en Nitrógeno líquido (-190°C).

Andrade Martins CB (6) en la tesis doctoral “Influencia en la calidad espermática de la adición de distintas concentraciones de crioprotectores para la conservación del semen canino”, el objetivo de esta tesis doctoral fue valorar visualmente la motilidad total y progresiva de los espermatozoides en refrigeración diluidos en medios suplementados con los aminoácidos glutamina, prolina y taurina, a concentraciones de 30, 50 y 80 mm, a fin de determinar cuál de los aminoácidos y en que concentración permite conservar mejor las características de motilidad del espermatozoide canino en refrigeración a 4°C. Para ello, se ha utilizado la fracción espermática de 9 eyaculados de 9 perros Pastor Alemán de entre 3 y 6 años. Dichos eyaculados fueron agrupados de 3 en 3 a fin de constituir pools y así, obtener una mayor variabilidad de individuos, al mismo tiempo que un mayor volumen y número de espermatozoides por muestra a analizar; de modo que fuera posible realizar los análisis a lo largo de los días. Cada pool fue dividido en 10 alícuotas, las cuales se mezclaron con cada uno de los medios diluyentes en la proporción 1:5 (semen: diluyente) dando lugar a una concentración de aproximadamente  $50 \times 10^6$  espermatozoides por mL. Las mediciones se realizaron visualmente a las 24, 48, 72, 96 y 168 horas (7 días). El estudio estadístico consistió en la comparación mediante análisis de la varianza (ANOVA) y el test de comparaciones múltiples de Duncan para  $p < 0,05$ , siendo realizadas 3 réplicas en

este estudio preliminar. Se concluyó que la utilización como crioprotector, para la congelación del semen canino, de etilenglicol al 4% presenta resultados similares de motilidad a los obtenidos con 8% de glicerol; sin embargo, resulta perjudicial cuando se emplea al 8%. La adición de Equex STM Paste® a un diluyente con 5% de etilenglicol mejora los resultados frente al 4% de etilenglicol o el 8% de glicerol. Sin embargo, el uso de etilenglicol no obtuvo mejores resultados que el diluyente Uppsala Equex, el cual permite una mayor supervivencia celular post-descongelación.

## 2.2. Crioconservación

La crioconservación es el proceso mediante el cual los espermatozoides y su capacidad fecundante son reducidos o interrumpidos del metabolismo celular por un periodo prolongado. Éste objetivo se puede conseguir por medio de la refrigeración, aunque principalmente mediante la criopreservación siendo necesario mantener el semen a temperaturas inferiores a  $-130^{\circ}\text{C}$  para detener completamente los procesos metabólicos (4). Esta técnica permite el almacenamiento de semen por periodos muy prolongados, brindando muchos beneficios entre los cuales se encuentran: facilitar las posibilidades de reproducción de diversos individuos, salvaguardar las características genéticas beneficiosas encaminadas a las mejoras de las especies, y para la conservación de especies silvestres y razas caninas que están en extinción o cuentan con pocos ejemplares (7).

### 2.2.1 Etapas del proceso de crioconservación

Durante los procesos de congelación y descongelación del semen, las células se exponen a un medio hiperosmótico lo que genera cambios morfológicos en éstas. Al exponerse las células a este medio hiperosmótico se genera una contracción

celular inicial; la cual puede revertirse al añadir crioprotectores que ingresan o recubren las células favoreciendo la protección de las mismas (8). El proceso de crioconservación de semen incluye cinco etapas: dilución, refrigeración, adición del crioprotector, congelación y descongelación. Mientras que algunas etapas son relativamente inocuas, otras son muy estresantes, como es el caso de la curva de enfriamiento y la congelación. Cada etapa del protocolo utilizado ejerce una interacción especial con la estructura, la función de la membrana y con el metabolismo celular; pudiendo el espermatozoide perder su capacidad de funcionar normalmente en cualquiera de estas etapas (09).

#### a) Dilución

Inmediatamente después de colectado el semen, el primer paso en el proceso es su dilución en un medio que lo proteja adecuadamente durante el proceso de cripreservación, a este medio se le denominara dilutor. Los dilutores deberán mantener la osmolaridad, el pH y la concentración adecuada de iones del semen y fundamentalmente debe aportar una fuente de energía; finalmente debe proteger el semen de cualquier efecto nocivo causado por la congelación y la descongelación (10).

#### b) Refrigeración

En los años 80 y 90 los diluyentes utilizados para refrigeración estaban constituidos esencialmente por yema de huevo o leche (10). Tanto la yema de huevo como la leche aportan lipoproteínas de baja densidad, principalmente fosfolípidos que actúan estabilizando las membranas nucleares sin que se produzcan cambios aparentes en la composición de las mismas minimizando los efectos nocivos del frío durante la curva de enfriamiento (11).

### c) Adición del crioprotector

La utilización de un agente crioprotector es indispensable en la minimización de los daños que se producen en los espermatozoides durante el proceso de congelación (12). El papel de los crioprotectores es fundamental en el proceso de congelación y descongelación de células vivas pues proporciona protección contra las fuertes alteraciones que se producen en las estructuras intracelulares, extracelulares y en la composición química (13).

### d) Congelación

A diferencia del semen refrigerado, el semen que se somete al proceso de congelación, debe tener un crioprotector. Existen diversos crioprotectores, pero el más utilizado en la congelación de espermatozoides de perro, así como en los espermatozoides de otras especies, es el glicerol (14). La congelación de semen debe permitir realizar posteriormente una inseminación artificial con éxito, para ello se necesita de técnicas complejas. Además para proteger el curso de las etapas que han de descender su temperatura en nitrógeno líquido (- 196°C) y, la recuperación rápida de temperatura en el momento de la descongelación, es necesaria la mezcla con un diluyente apropiado (2).

#### Primer paso o período de equilibrio:

La muestra es enfriada lentamente desde la temperatura ambiente hasta una temperatura por encima de su punto de congelación (15). Por esto las pajuelas deben mantenerse a 5°C por 2 a 6 horas antes de someterse a cualquier velocidad de congelación para así obtener una buena congelabilidad y fertilidad (16).



Segundo paso:

La muestra es congelada tan rápido como sea posible, minimizando el tamaño de los cristales de hielo (15).

Tercer paso:

La muestra congelada alcanza la temperatura de almacenamiento (-196°C), lo suficientemente rápido para evitar la re cristalización <sup>(15)</sup>. Durante el proceso de enfriamiento, se producen en los espermatozoides efectos dañinos, los cuales pueden ser reducidos con crioprotectores (16).

e) Descongelación

La descongelación de espermatozoides de perro a tasas de tiempo mejoraría la viabilidad espermática. La descongelación en agua a 70°C por 8 minutos, prolongaría la sobrevivencia en relación a la descongelación más lenta a 38°C por 1 minuto. Los factores que influyen sobre la motilidad tras la descongelación son:

- Variación individual entre eyaculados.
- La congelación/descongelación aumenta la incidencia de anomalías en el acrosoma.
- La presencia de gotas proximales, cuellos rotos y piezas medias curvadas y retorcidas suelen ser causa de mala motilidad tras la descongelación (9).

### 2.2.2 Factores determinantes de la crioconservación

En los procesos de criopreservación de semen canino existen diversos factores que influyen en su capacidad fertilizante. Las células espermáticas son expuestas a soluciones que contienen agentes crioprotectores, los cuales evitan parcialmente la formación de hielo intracelular y el daño en las membranas. Sin embargo, dichas sustancias, sumadas a los severos cambios térmicos y osmóticos propios de la técnica, pueden tener otros efectos adversos sobre los espermatozoides, como las alteraciones en el ADN, el aparato genético, la actividad mitocondrial, el rompimiento de membranas por la peroxidación de los lípidos, y en los acrosomas por daños como el hinchamiento, la distribución no uniforme de su contenido, y la vesiculación de la membrana externa acrosomal. Dichas alteraciones han sido directamente relacionadas con la reducción en la fertilidad del semen canino criopreservado, principalmente cuando involucran daños de la estructura y función de la membrana plasmática (3).

### 2.2.3 Agentes crioprotectores

Un crioprotector es una pequeña molécula que penetra fácilmente en el interior de las células y, de esta forma, reduce el punto de congelación del agua (17). son sustancias hidrosolubles de baja toxicidad que disminuyen el punto eutéctico del semen diluido (18). El descenso del punto eutéctico implica que el espermatozoide alcanzara la máxima concentración de solutos a una menor temperatura, permitiendo que el espermatozoide se deshidrate y sufra un menor estrés osmótico (19). La mayor deshidratación celular sufrida en el espermatozoide gracias al empleo de crioprotectores previene la formación de hielo intracelular, disminuyendo las lesiones en la membrana por el proceso de criopreservación, al mismo tiempo se evita los efectos adversos de la deshidratación excesiva por que el crioprotector ingresa al medio intracelular del espermatozoide evitando el colapso celular (20).

Cuando la temperatura es inferior a  $-40^{\circ}\text{C}$ , la concentración de crioprotector llega a ser tan alta en la solución no congelada restante, que el hielo deja de crecer. Las células sobreviven suspendidas en el líquido residual no congelado entre los cristales de hielo. Cuando la temperatura se sitúa por debajo de  $-100^{\circ}\text{C}$  aproximadamente, esta solución no congelada, que contiene las células se transforma en un sólido vítreo. Esta es la forma en la cual los crioprotectores protegen a las células (17).

Los agentes crioprotectores constituyen buenos medios de dilución al realizar las funciones:

- a) Aportan nutrientes como una fuente de energía,
- b) Protegen contra el efecto nocivo del enfriamiento rápido,
- c) Son amortiguadores que impiden cambios perjudiciales en el pH al formarse ácido láctico,
- d) Mantienen la presión osmótica apropiada y el balance electrolítico
- e) Inhiben la proliferación bacteriana,
- f) Incrementan el volumen del semen de modo que éste puede emplearse para múltiples inseminaciones y
- g) Protegen a las células espermáticas durante el congelamiento (21).

#### 2.2.4. Clasificación de crioprotectores

Los crioprotectores se han clasificado según su capacidad para atravesar la membrana: en penetrantes como glicerol, Dimetilsulfoxido (DMSO), etilenglicol, y en no-penetrantes incluyendo determinados azúcares como la trehalosa, sacarosa y lactosa; actualmente el más usado en la criopreservación de semen canino es el glicerol (22).

## a) Glicerol

En el grupo de los crioprotectores penetrantes, se encuentra el glicerol, el cual es un alcohol con tres grupos hidroxilos ( $C_3H_8O_3$ ) de alta permeabilidad (23) y se une directamente a los fosfolípidos de la membrana reduciendo su fluidez e interactuando con las proteínas y glicoproteínas de la membrana regula la deshidratación espermática durante el congelamiento al reemplazar osmóticamente el agua intracelular (7).

El glicerol es el crioprotector más utilizado en los protocolos de congelación del semen de perro, y prácticamente en todas las especies domésticas. Su descubrimiento como agente crioprotector se debe a Polge y ha marcado un avance notable en la preservación del semen, por medio de la congelación (24).

Su bajo peso molecular le permite ingresar a la célula mediante los canales aquaporin 7 y reemplazar osmóticamente el agua intracelular durante el proceso de congelamiento, esto combinado con una velocidad de congelamiento lenta reduce la formación de cristales de hielo intracelulares (25).

El glicerol posee como limitante su toxicidad parcial debida al estrés osmótico que genera. Dado que tiene una menor velocidad de difusión a través de la membrana plasmática respecto a otros crioprotectores. De igual forma, se reporta que el glicerol causa la alteración de la unión del espermatozoide con el oocito, lo cual disminuye la capacidad fertilizante del semen y, por lo tanto, reduce las tasas de concepción posteriores a la inseminación artificial (3).

## b) DMSO

Dimetilsulfoxido (DMSO) es un versátil compuesto químico, es el miembro más simple del grupo de los alquil sulfóxidos, de fórmula química  $\text{CH}_3\text{SOCH}_3$ . Es una sustancia que se puede usar como crioprotector o criopreservante ya que pasa a través de la membrana celular más fácilmente que el glicerol, evita la cristalización del agua dentro de la célula. La concentración en la cual se han obtenido mejores resultados con este crioprotector es al 5% (26).

Esta sustancia permite la fusión de las membranas a una temperatura aproximada a  $0^\circ\text{C}$ , evitando la difusión de los cationes y demás componentes intracelulares a través de las roturas de membrana causadas por la formación intracelular de hielo. Su adición al diluyente no ha sido beneficiosa para la supervivencia del espermatozoide descongelado de perro., sólo o en combinación con el glicerol, resultando en una marcada reducción de la motilidad (27).

## c) Etilenglicol

El etilenglicol (EG) es un polialcohol ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$ ) crioprotector cuyo peso molecular (62,07) es inferior al del glicerol (92,10). Es utilizado universalmente en la congelación de tejido y de embriones de distintas especies (6).

La permeabilidad de las células para cada crioprotector es diferente y se ha visto que el etilenglicol penetra mucho más rápido a las células espermáticas de humano, ratón y verraco. Rota realizó una comparación entre el glicerol y el etilenglicol en el diluyente tris-yema de huevo midiendo la motilidad, longevidad y funcionalidad de la membrana del espermatozoide canino encontrando diferencias significativas siendo muy superior el etilenglicol con una motilidad del  $63.6\% \pm$

6.4% y para el glicerol  $46\% \pm 9.9\%$ . Con un descenso dramático en la motilidad en la primera hora, de igual forma la integridad funcional de la membrana plasmática en la prueba hiposmótica durante la primera hora fue superior el etilenglicol ( $63\% \pm 3\%$ ) que el glicerol ( $59\% \pm 6.2\%$ ) pero al finalizar las 4 horas fue superior el glicerol con un porcentaje de  $31\% \pm 4.1\%$  mientras que el etilenglicol obtuvo un porcentaje de  $25\% \pm 2.3\%$  (27).

### 2.3. Diluyentes de semen canino

Los dilutores deberán mantener la osmolaridad, el pH y la concentración adecuada de iones del semen y fundamentalmente debe aportar una fuente de energía; finalmente debe proteger el semen de cualquier efecto nocivo causado por la congelación y descongelación. En los años 80 y 90 los diluyentes utilizados para refrigeración estaban constituidos esencialmente por yema de huevo o leche (28).

Tanto la yema de huevo como la leche aportan lipoproteínas de baja densidad, principalmente fosfolípidos que actúan estabilizando las membranas nucleares sin que se produzcan cambios aparentes en la composición de las mismas minimizando los efectos nocivos del frío durante la curva de enfriamiento (11). Para inhibir la proliferación de microorganismos en el semen, se agregan penicilinas, estreptomycin, polimixina B, u otras combinaciones antibióticas (29).

Actualmente, el dilutor de semen canino más utilizado en situaciones prácticas y experimentales sigue siendo en base a citrato y tris como buffer y azúcares, principalmente lactosa, glucosa y fructosa en bajas concentraciones como fuente energética, con 20% de yema de huevo y glicerol como agente crioprotector (4).

### 2.3.1. Tipos de Diluyentes

#### a) TRIS

El compuesto TRIS (hidroximetil-aminometano) es una sustancia orgánica que posee la particularidad de formar soluciones acuosas y sistemas reguladores de la concentración de iones de hidrogeno, el cual protege a los espermatozoides de los cambios de pH; por este motivo para ser utilizado en la criopreservación de semen requiere estar asociado con el ácido cítrico (29).

El TRIS es utilizado en la criopreservación de semen por su capacidad amortiguadora de pH, osmótica y ser muy poco toxico aún en altas concentraciones; además neutraliza los productos de desecho resultantes del metabolismo de los espermatozoides y particularmente al ácido láctico (30).

Para proveer de energía al espermatozoide, los dilutores deben contener azucares del tipo monosacáridos. La principal fuente de energía para los espermatozoides es la fructosa, sin embargo, este también es capaz de metabolizar otros monosacáridos como la glucosa y manosa; las células glucolizan mejor la fructosa que la glucosa, esto se debe a que la fructosa no requiere el paso en el metabolismo de glucosa catalizado por la fosfofructoquinasa (31).

#### b) Yema de huevo

La yema de huevo es un componente básico que está presente en casi todos los diluyentes para refrigeración y congelación, cuyas características protectoras contra el frío son conocidas desde los trabajos de Phillips y Lardy (4).

Debido a la compleja naturaleza de la yema, los investigadores se encontraron con dificultades para determinar los factores específicos responsables de los efectos beneficiosos y de su modo de actuación. Además se precisó que la porción lipídica de la yema constituida por los fosfolípidos, lecitina y cefalina, es efectiva en la protección contra el choque térmico, hecho confirmado por Blackshaw, quien también precisó que la lecitina era el principal fosfolípidos protector pues impide el flujo y la acumulación de  $Ca^{2+}$  en el espermatozoide de toro y carnero <sup>(4)</sup>. Algunos trabajos atribuyen la actividad protectora de la yema, contra los choques térmicos y la pérdida de motilidad, a la interacción con la membrana plasmática, más concretamente, a la débil interacción de los fosfolípidos de la yema con la membrana plasmática (32).

También se ha sustentado que las lipoproteínas de baja densidad son los componentes de la yema que consiguen el efecto crioprotector, evitando el choque térmico, previniendo el daño peroxidativo y preservando la integridad de la membrana (33). Las investigaciones posteriores sobre la naturaleza de esta protección han revelado que la fracción catiónica e hidrosoluble de la yema, debido a su carga, compite con los péptidos catiónicos del plasma seminal en la unión a la membrana del espermatozoide, evitando los efectos negativos de los péptidos (4).

## 2.4. Calidad de semen canino

### 2.4.1. Semen canino

El semen canino está constituido por dos componentes, uno celular conformado por espermatozoides y uno líquido o plasma seminal constituido principalmente por la secreción prostática (única glándula sexual accesoria en el perro (34).



#### 2.4.1.1. El proceso de la espermatogénesis:

Tiene 3 fases:

##### a) Espermatocitogénesis:

Es la formación de espermatídes a partir de las espermatogonias (35).

##### b) Espermiogénesis:

Las espermatídes se transforman en espermatídas maduras que se liberarán al lumen de los túbulos seminíferos, transformadas en espermatozoides (36).

##### c) Espermiación:

Es la liberación de los espermatozoides desde la membrana basal de los túbulos seminíferos hasta el lumen (36).

#### 2.4.1.2. Capacitación de los espermatozoides

Se da mientras los espermatozoides avanzan por la región caudal del istmo del oviducto. Solamente los espermatozoides vivos que tiene acrosomas reactivos pueden capacitarse (36).

#### 2.4.2. Características del semen canino

Por lo general, el color del semen de perro va de blanco a opalescente y opaco. La intensidad de la opacidad depende de la concentración de espermatozoides. Un semen claro e incoloro sugiere azoospermia. Se puede encontrar un tinte amarillento por contaminación con orina o pus. Un tinte verde, con o sin cúmulos,

coágulos o escamas, sugiere pus e infección en el aparato reproductivo. Un tinte rojo sugiere la presencia de sangre, que suele provenir de la próstata o de un pene traumatizado. La presencia de sangre no necesariamente indica enfermedad. Sin embargo, la recurrencia de cualquier anomalía causa preocupación y sugiere un estudio adicional (37).

El olor natural del semen es característico para cada especie, por lo tanto sólo puede ser reconocido por la experiencia. Se valora la motilidad de los espermatozoides individuales tan pronto como sea posible después de obtener la muestra de semen. Se coloca una gota de semen en un porta objeto previamente entibiado y se observa al microscopio a 200x hasta 400x en cuanto a movimientos de avance progresivo de espermatozoides individuales (37).

#### 2.4.3. Partes del semen canino

El eyaculado del perro está constituido por 3 fracciones bien diferenciadas:

Primera fracción:

Es transparente, de consistencia acuosa, proviene de la próstata, no contiene espermatozoides y su emisión dura de 30 a 50 segundos. Representa el 2-3% del volumen total, es llamada “fracción pre espermática” (35).

Segunda fracción:

Tiene un color que varía entre gris y blanco lechoso y su consistencia es más viscosa que la primera; proviene del epidídimo y contiene a los espermatozoides; su emisión tiene una duración de 50 a 80 segundos. Constituye del 6-7% del volumen total, es la “fracción espermática” (35).

Tercera fracción:

Proviene de la próstata y es de color transparente, de consistencia acuosa, luego de la fracción espermática comienzan movimientos pulsátiles de la uretra. Esta fracción no contiene espermatozoides, es la más abundante y su emisión tiene una duración promedio de 3 a 30 minutos. Del volumen total eyaculado, ocupa el 90%. Se llama “fracción prostática” (35). La función fisiológica de las distintas fracciones del eyaculado no se conoce, pero se sostiene que la primera podría arrastrar la orina de la uretra del perro, mientras que la tercera, arrastraría la segunda fracción a través del cérvix de la hembra (38).

La presencia de adrenalina, noradrenalina y prostaglandinas en el semen puede sugerir que el rol es la estimulación del tracto reproductivo de la hembra para el transporte espermático, controlando la frecuencia y amplitud de las contracciones de la musculatura circular y longitudinal del tracto reproductivo (39).

#### 2.4.4. Criterios para la evaluación del semen canino

Los parámetros seminales de movilidad del 70%, morfología del 70% de espermatozoides normales, y espermatozoides vivos 80%, deben tratar de conservarse lo mejor posible en el semen congelado, por tal motivo varios estudios muestran que concentraciones entre el 2% y 10% de glicerol han sido usadas con el fin de preservar las características fecundantes de muestras seminales sometidas a procesos de congelación y descongelación (1).

Existen una gran variedad de parámetros y pruebas de laboratorio que han sido probadas para evaluar la calidad del semen usado para I.A, y así predecir la capacidad fecundante del mismo. El uso de estas pruebas en forma combinada puede aumentar la exactitud en la estimación de la función espermática (40).

Los principales parámetros para la evaluación del semen canino son:

a) Apariencia

El semen debe ser de aspecto cremoso y de color blanquecino, debido a la presencia de los espermatozoides. Sin embargo, estas características varían dependiente fundamentalmente de la concentración espermática del eyaculado y de la presencia de concentraciones. Por ejemplo, una coloración amarillo intenso, indica presencia de orina, la cual es espermicida por sus contenidos ureicos y p H ácido, afectando la calidad del semen. Una coloración verde o roja, pueden indicar patologías o contaminaciones que pueden conducir a la decisión de descarte del semen (41).

b) Volumen

El volumen es medido mediante un tubo colector graduado; donde la cantidad de eyaculado varía según la edad, el tamaño, la frecuencia de colecta, métodos y duración de las colectas. El volumen normal varía de 1 a 40 ml por eyaculado (42).

c) Movilidad masal

Para la observación de la movilidad masal se examina una muestra de semen no diluido en aumento de 4X o 10X para observar la existencia eventual de “oleadas”, movimientos de flujo y reflujo provocados por la reunión y posterior dispersión de los espermatozoides. La existencia de estas ondas se considera generalmente como indicio de buena vitalidad y alta concentración de los espermatozoides en el eyaculado (41).

#### d) Movilidad individual

Este parámetro es utilizado como indicador de la función espermática. La movilidad es normal cuando el espermatozoide presenta un movimiento progresivo que le permite avanzar con cierta rapidez. Normalmente se desplazan gracias a movimientos de la cola al mismo tiempo que experimentan una rotación alrededor de su eje longitudinal, de tal forma que la progresión final resulta rectilínea. Para evaluar la movilidad individual se utiliza un microscopio óptico y aumento de 40X. Una movilidad progresiva adecuada para inseminación artificial debe ser de 70% aproximadamente (41).

#### e) Morfología

La morfología espermática es un parámetro indispensable en la evaluación seminal, dado que intrínsecamente está implicada en los problemas de fertilidad tanto en la especie canina como en otras especies (43). Las anomalías de los espermatozoides se clasifican en primarias y secundarias:

##### Anormalidades primarias

Este tipo de anomalías ocurren durante espermatogénesis (dentro de los túbulos seminíferos), suelen ubicarse en la cabeza y porción media del espermatozoide (5).

##### Anormalidades secundarias

Estas son problemas en la maduración del mismo espermatozoide ocurre durante el tránsito a través del sistema de ductos del testículo y epidídimo. Como un ejemplo de esta anomalía es la gota citoplasmática. Deben ser menores al 20% del espermatozoide defectuoso en el perro normal. Las anomalías no deben ser

mayores al 30% de los defectos totales, es decir un semen normal debe tener un mínimo de 80% de espermatozoides morfológicamente normales (5).

#### f) Concentración

La concentración de un eyaculado se determina por medio de un hemocitómetro o por espectrofotometría. Una concentración normal para el semen canino está entre 200 y 1 200 millones de espermatozoides por mililitro, con un número total de espermatozoides por eyaculado entre 400 y 2 000 millones (44).

El número de espermatozoides por eyaculado varía dependiendo, en parte, de la edad, la masa testicular, la actividad sexual y la estación del año, Aman sugiere que las razas más grandes tienen una mayor concentración de espermatozoides que las pequeñas (45).

#### g) Integridad y funcionalidad de membrana

La integridad y funcionalidad de la membrana plasmática son esenciales para la conservación de la capacidad fertilizante del espermatozoide. Los colorantes vitales, permiten diferenciar espermatozoides muertos con base a la permeabilidad de la membrana al permitir el paso o no de los mismos. Las células cuya membrana plasmática es funcional y por lo tanto conservan la permeabilidad selectiva, no permiten el paso del colorante y se observan no teñidas. Por el contrario, cuando la membrana plasmática está alterada permite el paso del colorante y la célula se observa teñida (46).

Puede utilizarse colorantes vitales como la eosina/azul de anilina, azul de tripano, eosina/ negrosina. Otros parámetros de importancia en la evaluación del semen canino son el pH, que varía normalmente en un rango muy estrecho de 6.0 -7.5, con un promedio de 6.5. El cultivo de bacterias que suele producir un conteo menor a 10.000 unidades formadoras de colonias por mililitro, y debe ser negativo a *Mycoplasma* y *Brucella canis*. El número de leucocitos normal es menor a 200/ml. Y la determinación de una baja concentración o ausencia de fosfatasa alcalina en el plasma seminal indica una eyaculación incompleta o una obstrucción bilateral de los epidídimos o los conductos deferentes (44).

#### h) Prueba de HOST

La prueba de endosmosis (hypoosmotic swelling test - HOST) que consiste en someter a los espermatozoides a un medio de presión osmótica más baja que la fisiológica, lo que causa una entrada de agua en la célula con el objetivo de equilibrar la presión osmótica interna con la del medio externo. La entrada de agua provoca en la célula un hinchamiento y enrollamiento de la cola, mientras que las células con la membrana física o funcionalmente dañada no experimentan cambios en la forma de la cola. Por lo tanto, esta prueba se constituye en un signo de integridad funcional de la membrana espermática (47).

La prueba de HOST ha sido adaptado para evaluar espermatozoides de varias especies domésticas incluyendo el perro, en donde se encontró que el hinchamiento hipoosmótico estaba relacionado directamente proporcional con la movilidad espermática, sin embargo no se ha relacionado la respuesta a HOST con la capacidad fertilizante del espermatozoide en caninos (48).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Espacio y tiempo

##### 3.1.1 Espacio

El estudio se realizó en el Laboratorio Central de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria, de la Universidad Alas Peruanas que se encuentra en el distrito de Pachacámac (12° 14' 3" y longitud 76° 52') ubicado en la provincia de Lima en el valle costero formado por el río Lurín a 30 km. de distancia al sur de Lima. La universidad Alas Peruanas es una universidad privada cuya sede principal se ubica en la ciudad de Lima. En el laboratorio de la Universidad Alas Peruanas se realiza con cierta frecuencia criopreservación de semen de especies como bovino, equino y ovino. El laboratorio cuenta con los equipos de crioconservación y los materiales necesarios para los análisis de conservación y evaluación de la calidad del semen canino.

##### 3.1.2. Tiempo

La tesis se desarrolló entre los meses de febrero a octubre del 2016, en el distrito de Pachacámac que presenta un clima templado con un promedio de 22°C, con una humedad relativa de 64% y se encuentra a 75 msnm.



## 3.2. Población y muestra

### 3.2.1. Población

La población estuvo conformada por 12 perros machos mestizos, cuyas edades fluctúan entre los 2 y 5 años de edad, los cuales fueron cedidos voluntariamente por sus propietarios. Los machos elegidos son de crianza doméstica; además se cuenta con la historia clínica de los pacientes, cuentan con planes sanitarios al día (desparasitación externa e interna y certificado de vacunas y de buena salud al momento de la toma de la muestra). Negativo a *Brucella canis*. La dieta que recibieron es a base de alimento comercial, comida mixta (alimento balanceado y casero) y sólo alimento casero (véase anexo 1). Por criterios de exclusión que se describe más adelante, la población se reduce a 4 caninos para los procesos de criopreservación de semen canino, descartándose de esta manera a los otros 8 individuos.

### 3.2.2. Muestra

Por la modalidad de la investigación la muestra es igual a la población. La muestra usada fue no probabilístico por conveniencia. En las muestras no probabilísticas, la elección de los elementos no depende de la probabilidad, sino de causas relacionadas con las características de la investigación o de quien hace la muestra. Importante considerar que Las muestras no probabilísticas son un subgrupo de la población en la que la elección de los elementos no depende de la probabilidad sino de las características de la investigación (49).

### 3.3. Diseño de investigación

El diseño de investigación que se usa es cuasi experimental: con Pre y Post Prueba. Los cuasi experimentos se llaman así porque su control es mínimo. Consiste en administrar un estímulo o tratamiento (en este caso la manipulación del semen a través de la crioconservación) a un grupo, para medir su efecto en la variable dependiente (calidad del semen canino) (49).

### 3.4. Equipos y procedimiento

#### 3.4.1. Equipos

- Microscopio óptico
- Cámara de Neubauer
- Tanque de Baño María
- Tubos de plástico graduados
- Tanque de Nitrógeno líquido
- Nitrógeno líquido
- Termómetro digital
- Pipetas de diferente tamaño
- Guantes clínicos
- Pajuelas de 0.25mL
- Jeringuillas de insulina
- Jeringuillas de 3mL,
- Beacker de diferentes tamaños
- Solución de Eosina y Nigrosina
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Glicerol (diferentes concentraciones).
- Agua destilada
- Dextrosa al 5%

- Maquina selladora
- Caja de tecknopor
- TRIS (trizma base)
- Ácido cítrico
- Glucosa
- Balanza digital
- Homogenizador
- Imán para homogenizar
- Espátulas
- Probeta de vidrio de 100 MI
- Embudo de vidrio
- Papel filtro
- Papel manteca
- Biológico (yema de huevo y semen canino).

### 3.4.2. Procedimiento

#### 3.4.2.1. Obtención de semen

Método Usado: Manipulación digital

El método de manipulación digital consiste en la aplicación de masajes vigorosos en el bulbo del glande sobre el prepucio, hasta conseguir la erección del pene. Momento en el cual se retrae manualmente el prepucio a fin de exponer completamente del pene y bulbos del pene. Posteriormente se presiona y se relaja secuencialmente en la zona del bulbo hasta conseguir la eyaculación (4)

Los eyaculados fueron recolectados mediante la técnica de manipulación digital descrita anteriormente, previo acostumbamiento una vez por semana, durante 3 semanas sin perra celadora en el Laboratorio Central de la Escuela de Veterinaria

de la Universidad Alas Peruanas; colectándose sólo la segunda fracción seminal en un frasco graduado. La muestra colectada se mantuvo en baño maría a 37 °C para evitar el shock por cambio de temperatura, evitando así la muerte de espermatozoides.

Se obtuvieron un total de 12 eyaculados de los 4 caninos seleccionados; los 4 primeros eyaculados fueron usados para la prueba control, utilizándose para el estudio sólo los últimos 8 eyaculados.

#### 3.4.2.2. Evaluación seminal

Método Usado: Espermiograma convencional

Una vez colectada la segunda fracción de semen se procede a evaluarlas por espermiograma convencional (44) como se describe para especies domésticas.

Pasos

1. Registro de volumen de la 2da fracción en ml.

2. Motilidad progresiva

Se depositó una gota de semen en un portaobjeto sobre una platina temperada a 37°C, para determinar; porcentaje de espermatozoides con movimiento cefálico, en microscopio óptico a 40x, la evaluación es subjetiva.

### 3. Tinción de Eosina/ Nigrosina (vivos /muertos)

Se determinó el porcentaje de vivos/muertos con tinción de Blom (eosina–nigrosina), contabilizando 200 células bajo un aumento de 100x. La técnica se llevó a cabo de la siguiente manera:

- Se colocó una gota de semen fresco temperado a 37°C en una lámina portaobjetos previamente calentada a 37 °C; se adiciona 1 gota de eosina, se homogeniza y finalmente se agrega 1 gota de nigrosina, se homogeniza y se deja reposar por 1 minuto.
- Luego se procede a realizar el frotis.
- Se deja secar por 3 minutos y se contabiliza 200 células a 100x.
- El número de células vivas y muertas se determina, por la coloración de la cabeza del espermatozoide; siendo las células vivas los espermatozoides sin tinción y las muertas las que tomaron color rosado.

### 4. Concentración espermática

Determinada por recuento en cámara de Neubauer (hemocitómetro), previa dilución (1:200), en agua destilada. La técnica se llevó a cabo de la siguiente manera:

- Se hizo una dilución de semen en relación de 1:200 en agua destilada.
- Se homogenizó la muestra.
- Se dejó caer las 4 primeras gotas y luego se llenó por capilaridad la cámara de Neubauer para observarla al microscopio a 40x.

Conteo:

- Siguiendo las manecillas del reloj, empezamos desde el cuadrante medio, luego extremo izquierdo superior, el derecho superior, el derecho inferior y finalmente, el izquierdo inferior.
- No se toma en cuenta la parte externa de los cuadrantes.

Aplicación de fórmula:

$$\text{Esp} = \frac{E}{\text{SAD}} \times 100$$

Donde:

Esp: número de espermatozoides / mm<sup>3</sup>

E: número de espermatozoides contados

S: Superficie empleada en mm<sup>3</sup>

A: Altura de la cámara Neubauer

D: Dilución

Por lo tanto:

$$\text{Esp} = \frac{X}{1/25 \times 1/10 \times 1/200} \times 100$$

## 5. Prueba hiposmótica / Host

- El test de funcionalidad de membrana HOST se realizó usando una dilución de semen en relación de 1:10 en solución de dextrosa al 5% (252 mOsmol/L) <sup>(48)</sup>.
- Incubándose en baño maría por un periodo de 25 minutos a 25°C, y observación con microscopio (400X).
- Se estimó prueba positiva de la integridad de la membrana los diferentes grados de curvatura de colas espermáticas, realizando un recuento de 200 células por muestra <sup>(49)</sup>.

### 3.4.2.3. Congelación de semen canino

Técnica: Congelación por almacenaje en nitrógeno líquido.

La Congelación por almacenaje en nitrógeno líquido, es considerada como la mejor técnica para preservar semen a través del tiempo, debido a que se obtiene un porcentaje de espermatozoides móviles descongelados entre el 60 y 70%, y una tasa de fertilidad del 60% <sup>(4)</sup>.

Procedimiento:

#### a) Preparación de dilutor madre

- En un Beacker de 100 ml se agrega 50 ml de agua destilada y se adiciona 3.25 g de TRIS, 1g de glucosa y 1.8 g de ácido cítrico.
- Se homogeniza y se completa con agua destilada hasta 100 ml, homogenizar y reservar.
- De esta solución se retira 15 ml y se agrega 15 ml de yema de huevo.
- Homogenizar y filtrar la solución, utilizando una probeta de 100 ml y papel filtro.
- Incubar a 37 °C y reservar.

#### b) Preparación de dilutor glicerinado

- Rotular 3 Beacker de 10 ml para cada concentración de glicerol (4%; 5% y 6%).
- Del dilutor madre (filtrado), se retira 10 ml para cada concentración de glicerol y se coloca en el Beacker correspondiente.
- Para la concentración del 4% de glicerol se retira 0.8 ml de dilutor madre y se agrega 0.8 ml de glicerol, se homogeniza y se reserva.
- Para la concentración del 5% de glicerol se retira 1 ml de dilutor madre y se agrega ml de glicerol, se homogeniza y se reserva.

- Para la concentración del 6% de glicerol se retira 1.2 MI de dilutor madre y se agrega 1.2 MI de glicerol, se homogeniza y se reserva.
- Estas 3 concentraciones de glicerol (que inicialmente son 8%, 10% y 12%) se incuban en un cooler a 5 °C por 1 hora, junto a las pajillas y las jeringas.

c) Preparación de muestra de semen con cada concentración de glicerol

- Una vez colectada la 2da fracción de semen, se mide el volumen y se coloca en un Beacker de 5 ml para luego agregarle el dilutor madre por goteo lento en relación 1:1 (2ml de semen con 2 ml de dilutor madre); tanto el semen como el dilutor madre deben mantenerse a 37 °C.
- Homogenizar con la mano por 2 minutos e incubar en una caja de tecknopor a 5 °C por 2 horas.
- Rotular 3 Beacker de 5 ml para cada concentración de glicerol (4%, 5% y 6%)
- En el Beacker rotulado con 4% de glicerol se coloca 1 ml de semen incubado con dilutor madre y se le agrega lentamente por goteo, 1 ml de dilutor glicerinado, (resultando ahora la concentración del 8% en 4%). Siendo la relación entre dilutor glicerinado y muestra 1:1
- Homogenizar con la mano lentamente por 2 minutos.
- Repetir el procedimiento para las concentraciones del 5% y 6% respectivamente.
- Luego se procede a empacar las muestras de las 3 concentraciones de glicerol (4 %, 5% y 6%) en pajillas de 0.25 MI.
- Sellar.
- Incubar todas las pajillas por 20 minutos a 5 °C.



#### d) Criopreservación de semen canino

- Las pajillas incubadas se colocan de forma horizontal sobre una gradilla de 10 cm de altura dentro del cooler, la cual está sobre una superficie de 4cc de nitrógeno líquido.
- Se somete las pajillas a vapores de nitrógeno líquido por 10 minutos.
- Se sumerge inmediatamente en nitrógeno líquido.

#### 3.4.2.4. Evaluación del semen post descongelamiento

Las variables estudiadas en la presente investigación fueron la motilidad progresiva, Prueba de HOST, concentración espermática y tinción de eosina y nigrosina. Dichas variables se evaluaron 24 horas después de haberse finalizado el proceso de criopreservación. El descongelamiento se realizó sumergiendo a las pajillas en un recipiente con agua temperada a 37°C por 40 segundos.

#### Instrumento

El instrumento que se usó para medir la variable dependiente fue la ficha para características macroscópicas (véase anexo 2) encontradas en 12 eyaculados (2ª fracción), obtenidos por manipulación digital, de 4 caninos, que midió las diferentes características de semen canino.

#### 3.5. Diseño estadístico

##### 3.5.1. Estadística descriptiva

Para ello se usaron 4 cuadros para el análisis del semen fresco y congelado, sometido a diferentes niveles de concentración de glicerol. El cuadro 1 describe

las características iniciales de las muestras de semen canino utilizadas durante el estudio. El cuadro 2 se refiere al efecto de los tratamientos sobre la motilidad espermática luego del proceso de congelamiento/descongelamiento. El cuadro 3 menciona el efecto de los tratamientos sobre la integridad funcional de membrana (HOST) luego del proceso de congelamiento/descongelamiento. Y finalmente el cuadro 4 es el resumen de los resultados obtenidos en el estudio.

### 3.5.2. Análisis estadístico

Para medir la calidad del semen canino, se utilizó la prueba estadística de Análisis de Varianza, mediante la prueba de ANOVA y contrastando los resultados con la prueba de Tukey en el programa de MINITAB. Se realizó 3 tratamientos con cuatro repeticiones para cuatro pruebas diferentes (concentración espermática, motilidad progresiva, integridad de la membrana y tinción de eosina - nigrosina), dando un total de 16 unidades experimentales para cada tratamiento.

#### IV. RESULTADOS

Los resultados de la evaluación seminal de los 4 caninos analizados, se exponen en el cuadro 01; las muestras de la segunda fracción seminal fueron evaluadas inmediatamente después de ser colectadas; se evaluó volumen del eyaculado, concentración espermática y motilidad progresiva. Se seleccionaron para el presente estudio, por criterios de exclusión sólo aquellos caninos que tuvieron el 95 % de motilidad progresiva y concentración espermática mayor a 200 células, descartándose así de 12 individuos 8 .que no cumplieron dicho requisito. El cuadro 1 con los 12 caninos pre selección se puede observar en el anexo 1.

Cuadro 01. Características iniciales de las muestras de semen canino pre congelación.

EVALUACIÓN DE SEMEN POST CONGELACIÓN					
Razas	Cantidad en ml de 2da fracción	Motilidad progresiva (%)	Concentración espermática a / b	Prueba Host c / %	Tinción E/N d / %
Yorshire 2	0.7	95	220 / 1 100	178 / 89	178 / 91
Shihtzu	0.8	95	216 / 1 080	183 / 92	174 / 87
Mestizo 1	1.5	95	231 / 1 155	180 / 90	177 / 89
Mestizo 2	1.7	95	239 / 1 195	187 / 94	184 / 92
Prom	1.75	95	226.5 / 882.5	182 / 91.25	178.25 / 89.75

a = número de espermatozoides contados en cámara de Neubauer.

b = esp x 10<sup>6</sup> / ml, aplicando fórmula

c = número de espermatozoides contados

d = número de espermatozoides contados

Fuente: Registro de campo

Elaboración: Propia

RAZAS	TRATAMIENTO CON GLICEROL AL 4%		TRATAMIENTO CON GLICEROL AL 5 %		TRATAMIENTO CON GLICEROL AL 6%	
	Concentración espermática a / b	Motilidad Progresiva. (%)	Concentración espermática a / b	Motilidad Progresiva (%)	Concentración espermática a / b	Motilidad Progresiva (%)
Yorshire	107.75 / 540	65	162.75 / 815	85	86.25 / 430	30
Mestizo 1	110.25/550	75	176.25/ 880	85	107.75 /540	65
Shih tzu	101.75/510	75	168.25/ 840	85	79.5/ 400	30
Mestizo 2	136.25/680	85	182.5/ 915	95	83.5/ 420	45

El efecto de los tratamientos sobre las cuatro pruebas realizadas (Concentración Espermática, Motilidad Progresiva, prueba de Funcionalidad de la Membrana (HOST) y Tinción de Eosina/Nigrosina) en las muestras evaluadas, después del proceso de congelamiento/descongelamiento puede observarse en el cuadro 2a y 2b. En dichos cuadros se observa que el tratamiento 2 (glicerol al 5%) tuvo un rendimiento superior frente a los tratamientos 1 y 3 (glicerol al 4% y glicerol al 6%) respectivamente, ya que al realizar el Análisis de Varianza con la prueba de ANOVA y contrastación con la prueba de Tukey arroja diferencias significativas en los 3 tratamientos ( $\alpha = 0.05$ ) y un IC de 95%, las que se observan en los gráficos respectivos.

Cuadro 2a. Efecto de los tratamientos sobre la concentración espermática y motilidad progresiva luego del proceso de congelamiento/descongelamiento del semen canino.

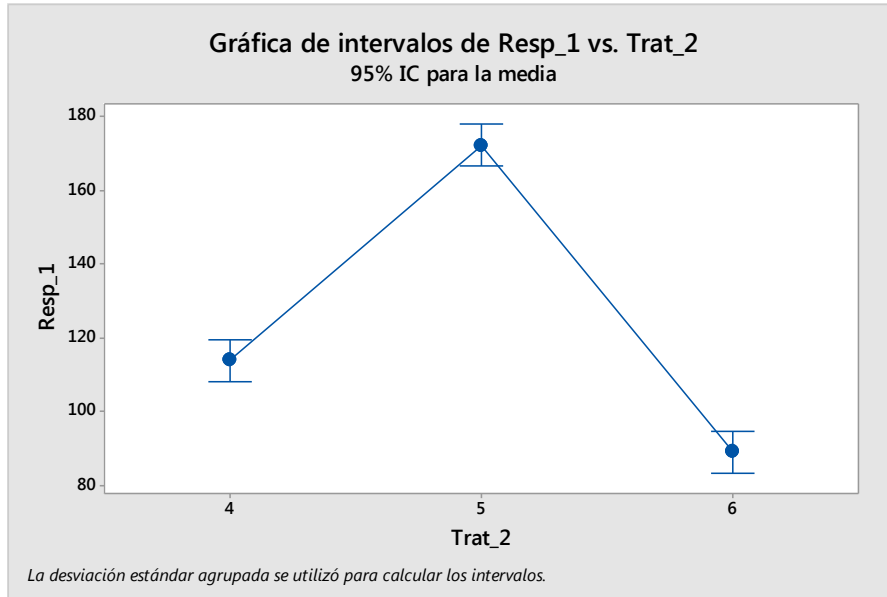
Prom.      114 ± 5.64 / 570      75 ± 4.98      172.44 ± 5.64 / 862.25      87.5 ± 4.98      89.25 ± 5.64 / 447.5      42.5 ± 4.98

a = número de espermatozoides contados en cámara de Neubauer.

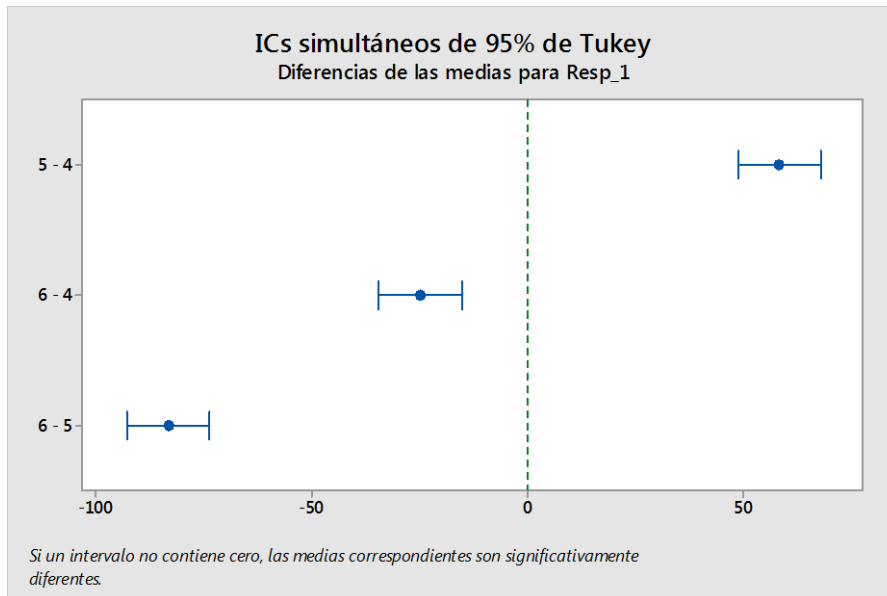
b = esp x 10<sup>6</sup> / ml, aplicando fórmula

Fuente: Registro de campo

Elaboración: Propia

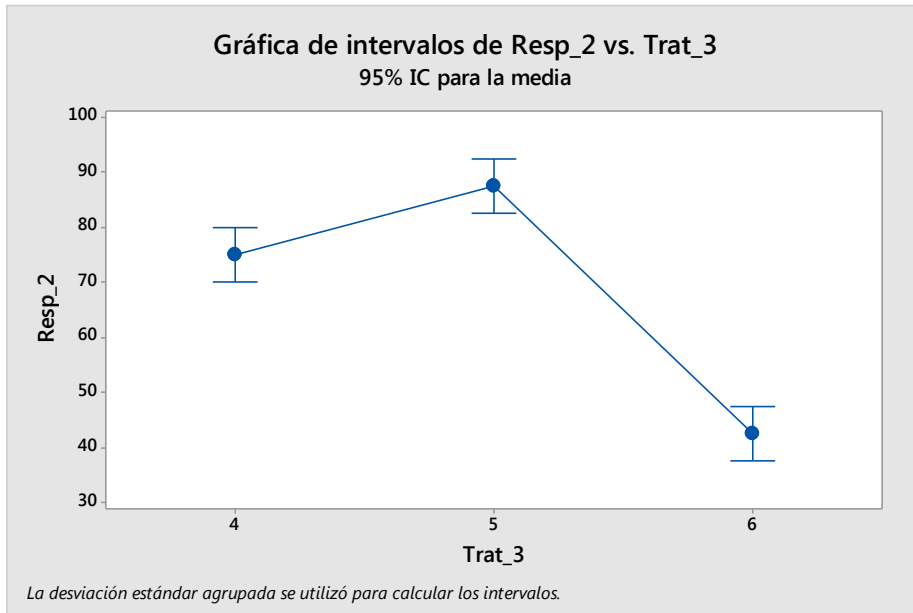


Gráfica 1: Análisis de varianza para la prueba de concentración espermática

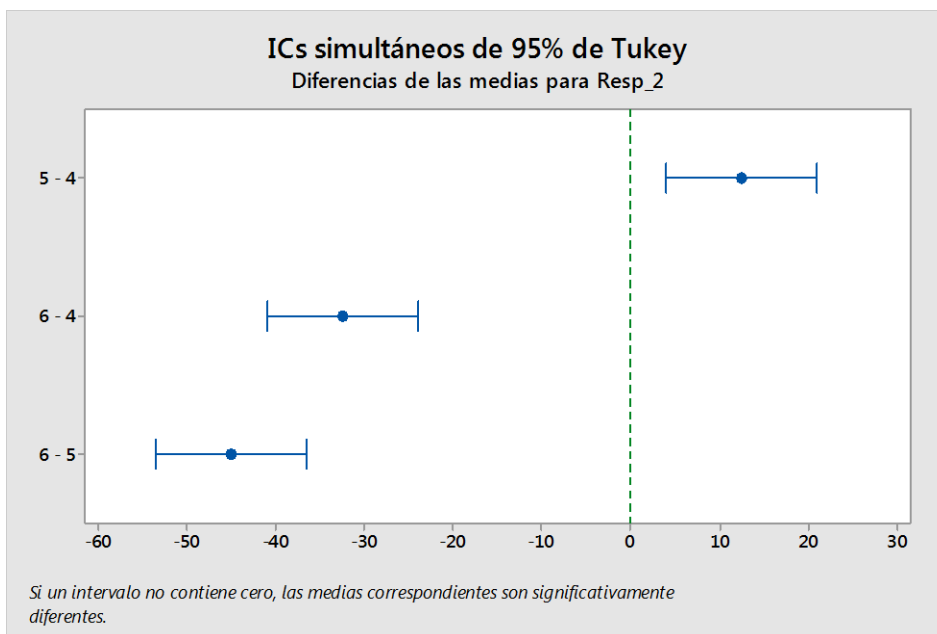


Gráfica 2: Prueba de contrastación de Tukey para concentración espermática

En los gráficos 1 y 2 se puede analizar que para la prueba de Concentración Espermática el tratamiento 2 mostró un  $\bar{x} \pm IC$   $172.44 \pm 5.64$  frente al tratamiento 1 con un  $\bar{x} \pm IC$   $114 \pm 5.64$  y tratamiento 3 con un  $\bar{x} \pm IC$   $89.25 \pm 5.64$  respectivamente y un  $R^2$  de 91.18% y  $R^2$  ajustado de 90.78 %.



Gráfica 3: Análisis de varianza para la prueba de motilidad progresiva



Gráfica 4: Prueba de contrastación de Tukey para motilidad progresiva

En los gráficos 03 y 04 se puede analizar que para la prueba de Motilidad Progresiva el tratamiento 2 mostró un  $x \pm IC$   $87.5 \pm 4.98$ , frente al tratamiento 1 con un  $x \pm IC$   $75 \pm 4.98$  y tratamiento 3 con un  $x \pm IC$   $42.5 \pm 4.98$  respectivamente y un  $R^2$  de 79.69% y  $R^2$  ajustado de 78.79 %.

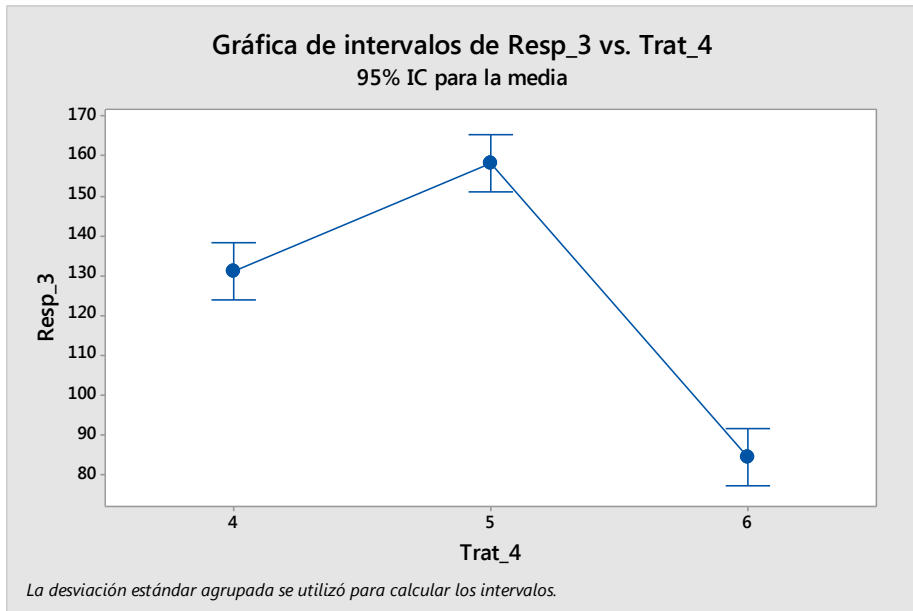
La evaluación de la integridad funcional de membrana se realizó mediante la prueba de estrés hiposmótico (HOST), considerando que los espermatozoides que reaccionaron a esta prueba (espermatozoides HOST+) presentaban la membrana funcionalmente intacta. La prueba de tinción de Eosina /Nigrosina se considera positiva las que presentaron la cabeza del espermatozoide sin coloración. En ambas pruebas se realiza el recuento células de un total de 200 observadas al microscopio a 40x.

Cuadro 2b. Efecto de los tratamientos a la prueba de Host y Tinción de Eosina / Nigrosina luego del proceso de congelamiento/descongelamiento del semen canino.

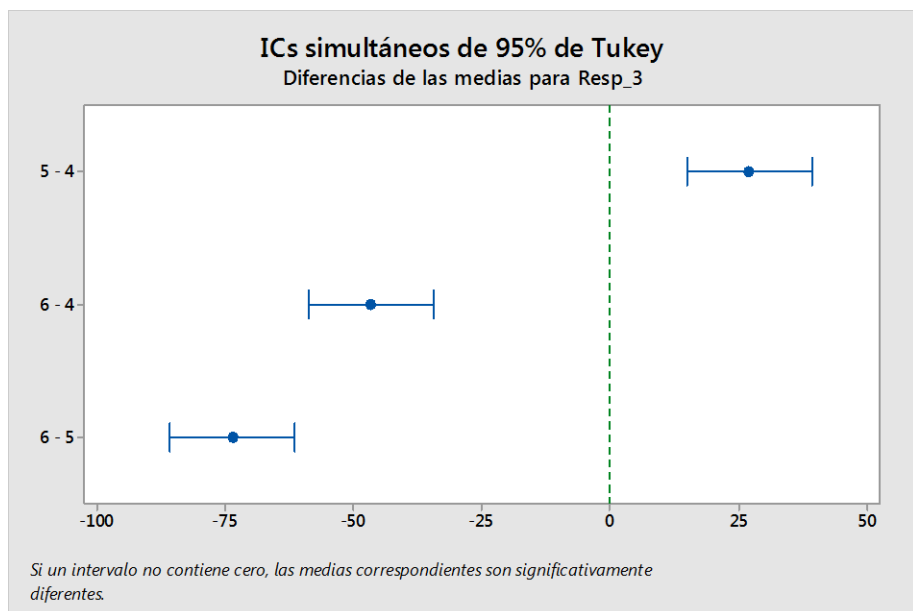
<b>EVALUACIÓN DE SEMEN POST CONGELACIÓN</b>						
<b>RAZAS</b>	<b>TRATAMIENTO CON GLICEROL AL 4%</b>		<b>TRATAMIENTO CON GLICEROL AL 5 %</b>		<b>TRATAMIENTO CON GLICEROL AL 6%</b>	
	Prueba de Host	Tinción Eos/Nigr.	Prueba de Host	Tinción Eos/Nigr.	Prueba de Host	Tinción Eos/Nigr.
<b>Yorshire</b>	118.75	85	147.75	140.25	67.25	58.25
<b>Mestizo 1</b>	134	93.5	160.75	152.25	118.75	85
<b>Shit hzu</b>	127.5	92.25	154.5	136.5	71.25	42.5
<b>Mestizo 2</b>	144.25	103.5	169.25	171.25	80.75	80.5
Prom	131.12 ± 7.15	93.56 ± 6.88	158.06 ± 7.15	150.06 ± 5.88	84.5 ± 7.14	66.56 ± 6.88

Fuente: Registro de campo

Elaboración: Propia



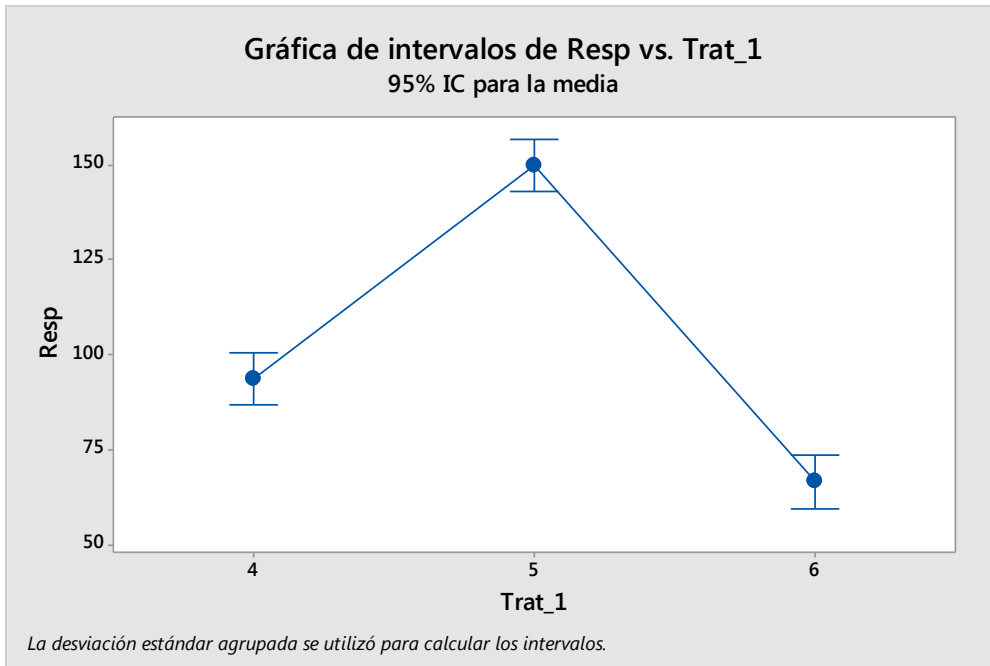
Gráfica 5: Análisis de varianza para la prueba de HOST



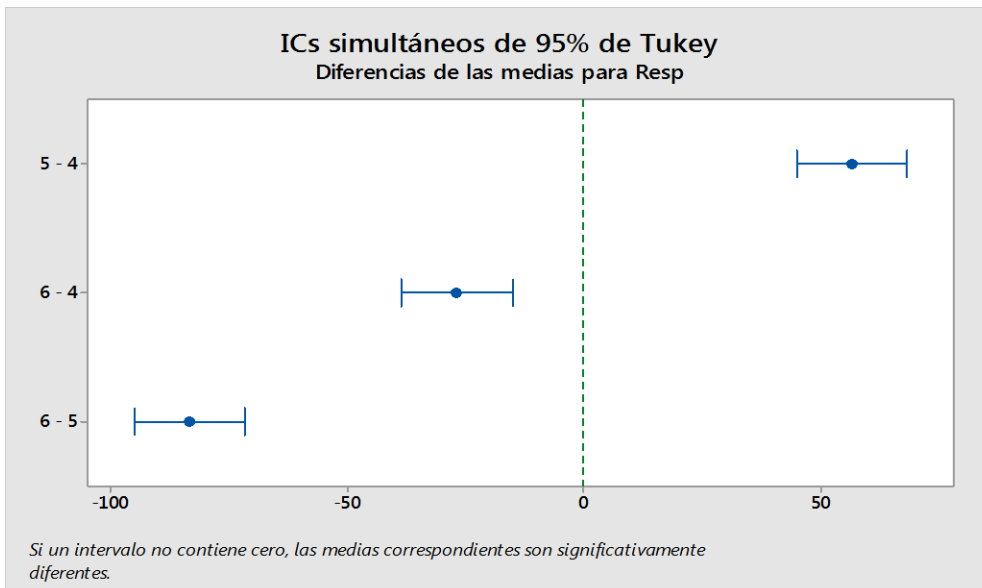
Gráfica 6: Prueba de contrastación de Tukey para la prueba de HOST

En los gráficos 05 y 06 se puede analizar que para la prueba de HOST el tratamiento 2 mostró un  $x \pm IC$   $158.06 \pm 7.15$ , frente al tratamiento 1 con un  $x \pm IC$   $131.12 \pm 7.15$  y tratamiento 3 con un  $x \pm IC$   $84.5 \pm 7.14$  respectivamente y un  $R^2$  de 83.03% y  $R^2$  ajustado de 82.28 %.





Gráfica 7: Análisis de varianza para la prueba de Tinción de Eosina y Nigrosia



Gráfica 8: Prueba de contrastación de Tukey Tinción de Eosina y Nigrosia

En los gráficos 07 y 08 se puede analizar que para la prueba de Tinción de Eosina/Nigrosina el tratamiento 2 mostró un  $x \pm IC$   $150.06 \pm 5.88$ , frente al tratamiento 1 con un  $x \pm IC$   $93.56 \pm 6.88$  y tratamiento 3 con un  $x \pm IC$   $66.56 \pm 6.88$  respectivamente y un  $R^2$  de 87.36% y  $R^2$  ajustado de 86.80 %.

Cuadro 03: Evaluación de semen fresco y semen post congelado, sometidos a la prueba de concentración espermática y motilidad progresiva

RAZAS	EVALUACION DE SEMEN FRESCO		EVALUACIÓN DE SEMEN POST CONGELACIÓN					
	Concentr. Esper. $\times 10^6$ ml	Motilidad. Progresiva %	TRATAMIENTO CON GLICEROL AL 4%		TRATAMIENTO CON GLICEROL AL 5 %		TRATAMIENTO CON GLICEROL AL 6%	
			Concent. Esp. $\times 10^6$ ml	Motilidad Progresiva %	Concent. Esper. $\times 10^6$ ml	Motilidad Progresiva %	Concent. Esp. $\times 10^6$ ml	Motilidad progresiva %
YORSHIRE	1 100	95	540	65	815	85	430	30
MESTIZO 1	1 155	95	550	75	880	85	540	65
SHIH TZU	1 080	95	510	75	840	85	400	30
MESTIZO 2	1 195	95	680	85	915	95	420	45
Prom	882.5	95	570	75	862.25	87.5	447.5	42.5

Fuente: Registro de campo

Elaboración: Propia

El siguiente cuadro comparativo muestra el semen canino fresco sometido a las pruebas de concentración espermática y motilidad progresiva, así como al semen post congelado con 3 concentraciones de glicerol sometido a las mismas pruebas; dando como resultado al canino 4 (mestizo 2) con mejores resultados para ambas pruebas; ya que se obtuvo en el semen post congelación una concentración espermática de  $915 \times 10^6$  ml de espermatozoides frente a  $1195 \times 10^6$  ml espermatozoides del semen fresco y en la prueba de motilidad progresiva se mantuvo un 95% tanto para semen post congelado como para semen fresco. De esta manera podemos concluir por los resultados, que la muestra de semen canino fresco sometida al 5% de glicerol resultó más eficiente, ya que soportó más los procesos de dilución, congelación y descongelación por las mínimas variaciones que presentó frente al semen fresco; además que la concentración espermática y motilidad progresiva de semen congelado con el 5% de glicerol se redujo en un 23,8% y 10.5% respectivamente, en comparación con el semen fresco.

Cuadro 04: Evaluación de semen fresco y semen post congelado, sometidos a la prueba de concentración espermática y motilidad progresiva

RAZAS	EVALUACION DE SEMEN PRE CONGELACIÓN		EVALUACIÓN DE SEMEN POST CONGELACIÓN					
	Prueba Host a / %	Tinción E/N b / %	TRATAMIENTO CON GLICEROL AL 4%		TRATAMIENTO CON GLICEROL AL 5 %		TRATAMIENTO CON GLICEROL AL 6%	
			Prueba Host a / %	Tinción E/N a / %	Prueba Host a / %	Tinción E/N a / %	Prueba Host a / %	Tinción E/N a / %
YORSHIRE	178 / 89	178 / 91	118.75 / 59	85 / 43	147.75 / 74	140.25 / 70	67.25 / 34	58.25 / 29
MESTIZO 1	183 / 92	174 / 87	134 / 67	93.5 / 47	160.75 / 80	152.25 / 76	118.75 / 59	85 / 43
SHIH TZU	180 / 90	177 / 89	127.5 / 64	92.25 / 46	154.5 / 77	136.5 / 68	71.25 / 36	42.5 / 21
MESTIZO 2	187 / 94	184 / 92	144.25 / 72	103.5 / 52	169.25 / 85	171.25 / 86	80.75 / 40	80.5 / 40
Prom	182 / 91.2	178.25 / 89.75	131 / 65.5	93.56 / 47	158.06 / 79	150.06 / 75	84.5 / 42.25	66.56 / 33.25

a = número de esp. contados; b = número de esp. contados

Fuente: Registro de campo

Elaboración: Propia

El cuadro 04 muestra los resultados de las pruebas del semen canino fresco sometido a las pruebas de Host y tinción de Eosina /Nigrosina, así como al semen post congelado con 3 concentraciones de glicerol sometido a las mismas pruebas; dando como resultado al canino 4 (mestizo 2) con mejores resultados para ambas pruebas; ya que se obtuvo en el semen post congelación para la prueba de Host un 85% de espermatozoides con membrana permeable y 86 % de células vivas para la tinción de Eosina/Nigrosina frente al 94% para ambas pruebas en semen fresco. Concluyendo de esta manera, que la muestra de semen canino fresco sometido al 5% de glicerol resultó más eficiente, ya que soportó más los procesos de dilución, congelación y descongelación por las mínimas variaciones que presentó frente al semen fresco. Tanto en la prueba de Host y tinción de Eosina / Nigrosina para semen congelado con el 5% de glicerol, hubo una disminución del 9% y 8% respectivamente en comparación con el semen fresco.

## V. DISCUSIÓN

La presente investigación muestra los resultados obtenidos tras congelar semen canino usando un diluyente no comercial y 3 concentraciones de glicerol como crioprotector.

### Análisis del semen fresco

De 4 perros disponibles se colectó 12 eyaculados, 1 eyaculado por semana, durante 3 semanas, utilizando sólo los 8 últimos eyaculados de los cuales se obtuvo 96 pajillas de 0.25ml; los 4 primeros se usaron para la prueba control. Estos fueron recolectados a través de manipulación digital, obteniéndose sólo la segunda fracción, ya que la primera y tercera fracción sólo aportan volumen y dificulta el proceso de congelación. El 100% de perros respondió a este procedimiento sin problemas, lo que concuerda con lo reportado por Rubilar (50), quien trabajó con 5 perros, obteniendo 20 eyaculados a través de manipulación digital sin perra en celo.

Respecto a las características macroscópicas de la calidad seminal del semen fresco, se mostraron ligeras variaciones entre individuos; en cuanto al volumen obtenido de la segunda fracción, varió en los 12 eyaculados, desde 0.4 ml hasta 1.7 ml, con un promedio de 1.75 ml; Rubilar (50) registró un volumen promedio de 1,9 ml  $\pm$  0.87 ml. Silva y col. (51) reportaron un volumen promedio para la segunda fracción de 1,54  $\pm$  0.64 ml, al trabajar con 12 perros de diferentes razas.

El olor para cada especie es considerado como *sui generis*, y sólo puede ser reconocido por la experiencia Diaz y Arancibia (52). En todas las muestras

obtenidas en este estudio, el olor fue calificado como *sui generis*, con diferentes intensidades en cada uno de ellos.

Las características microscópicas del semen pre congelación y post congelación evaluadas fueron: motilidad progresiva, concentración espermática, prueba de Host y tinción de Eosina/Nigrosina.

El porcentaje de motilidad progresiva pre congelación presentó una variación en los 12 caninos pre evaluados entre un 70 y 95 % con un promedio de 87,08%; Rubilar (50), reportó un porcentaje de motilidad progresiva similar, con un promedio de  $83,8 \pm 9.47\%$ . Rota y colaboradores (53), trabajaron con 11 perros, de diferentes razas, obteniendo un promedio de motilidad progresiva diferente ( $78,6 \pm 13,6\%$ ). Por otro lado, England (54), reportó un promedio de  $70,2 \pm 13,6\%$ , al trabajar con 65 perros de diferentes razas.

Mientras que en los 4 caninos seleccionados para el presente estudio, no hubo variación en los 8 eyaculados pre congelación, ya que todos presentaron un 95% de motilidad progresiva; similares resultados obtuvieron Silva y colaboradores (51), con un promedio de  $97,9 \pm 3,3 \%$  de motilidad progresiva. Los resultados de este estudio, fueron superiores a los valores anteriormente mencionados, siendo superiores al 70%, reportado como normal para la especie (Feldman y Nelson) (55).

La concentración espermática obtenida en este estudio fluctuó entre 1,080 y  $1,195 \times 10^6$  espermatozoides/ml, siendo mayor a los  $324,7 \pm 188,5 \times 10^6$  espermatozoides /ml, reportado por Rubilar en 1999 (50) y a los  $401 \pm 200,8 \times 10^6$  espermatozoides /ml, reportado por England el mismo año. Silva y col. en el 2003<sup>(51)</sup> reportaron un promedio de  $775 \times 10^6 \pm 187,2 \times 10^6 \pm$  espermatozoides /ml.

Todos estos resultados se encuentran dentro del rango de 200 a más de 1,000 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/ml totales, considerado como normal para un perro adulto, reportado por Feldman y Nelson en el 2007 (55).

El porcentaje de espermatozoides vivos mediante la técnica de Tinción de Eosina/Nigrosina de los 8 eyaculados fluctuó entre 87 y 92 %. El promedio obtenido fue de 89.75%, que fue mayor al 68,7% reportado por England en 1999 (53), pero menor al 91 % reportado por England y Allen en 1992 (56). En cambio Rubilar en 1999 (50), obtuvo un promedio de 92 ±4,7 %, siendo este mucho mayor a los anteriores señalados.

#### Análisis del semen congelado

De los 12 eyaculados seleccionados para congelar, sólo se trabajó con los últimos 8 eyaculados; obteniéndose un total de 96 pajuelas de 0.25ml cada uno; como se sometió las muestras de eyaculado a 3 concentraciones de glicerol, se optó por empacar sólo 4 pajillas para cada concentración de glicerol (durante 2 semanas); ya que las 4 primeras muestras de eyaculado, se usaron para la evaluación pre congelación o control. Obteniéndose así una concentración espermática para el tratamiento con glicerol al 4% de 510 x 10<sup>6</sup> a 680 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/ml, con el tratamiento con glicerol al 5% de 815 x 10<sup>6</sup> a 915 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/ml y finalmente para el tratamiento con glicerol al 6% de 400 x 10<sup>6</sup> a 540 x 10<sup>6</sup> espermatozoides /ml.

Entre los tratamientos evaluados para el porcentaje de motilidad progresiva, se encontró superioridad estadística del tratamiento con glicerol al 5% (85 a 95%) respecto al tratamiento con glicerol al 4 % ( 65 a 85%) y 6% ( 30 a 60 %), estos resultados difieren con los resultados obtenidos por Restrepo y col. (3) quienes usaron 5 perros de la raza pastor alemán en edades de 2 a 5 años utilizando

glicerol al 5% obtuvieron un resultado de  $(58\% \pm 7.8)$  y lo compararon con DMF 5%  $(44,5\% \pm 17,7)$ , glicerol 3%  $(18\% \pm 10.1)$  y DMF 3%  $(11,8 \pm 10,5)$ . Ello también difiere de los resultados reportados por Silva; quienes, utilizando 5 diferentes razas de caninos, y una concentración final de glicerol del 6%, obtuvieron valores de motilidad de  $54,6\% \pm 11,2$ .

Estos resultados del semen sometidos al tratamiento con glicerol al 4 y 5% fueron cercanos a los reportados por Sánchez (57)  $(83,8\% \pm 9,5)$ , quienes incluyeron perros de la raza pastor alemán en el estudio, y por Olivera (47) (80%), quienes procesaron muestras de perros de diferentes razas; dichos valores fueron muy similares de lo reportado por Sánchez  $(95,7 \pm 3.6)$  (5), lo cual sea probablemente explicado por la alta variabilidad de las características caninas, debido a la influencia de factores como la talla, el peso corporal de la raza, la edad y la alimentación.

El resultado obtenido para la prueba de HOST con tratamiento de glicerol al 5% (74 al 85 %), estos fueron muy superior comparado con los obtenido por Restrepo y col.  $(31,4\% \pm 3,8)$ , así como lo reportado por Sánchez y col. 2002  $(53,7 \pm 13\%)$  (48):

Los resultados obtenidos para criopreservar semen canino durante los meses de mayor luz demostraron que fueron más eficientes en esta época, ya que evita el shock térmico que se presenta en estaciones de invierno al exponer el semen colectado a temperaturas inferiores del medio ambiente; como lo menciona Gómez y Migliorisi (58) quien recomienda que una vez que el semen llega al laboratorio, se debe colocar en el Baño María a una temperatura de entre 32 y 35°C para comenzar con su evaluación. Se adjunta cuadros de temperatura del medio ambiente de febrero a octubre (véase anexo 15 a 22).

## VI. CONCLUSIONES

- 1.- El presente trabajo de investigación ha demostrado que la concentración de glicerol al 5 % es el que obtuvo mejores resultados para los procesos de criopreservación de semen canino, descartando así la concentración al 4 y 6 % de glicerol respectivamente.
- 2.- Para resultados óptimos en los procesos de criopreservación de semen canino se debe respetar estrictamente la temperatura durante todo el proceso y los tiempos de adición del dilutor y crioprotectores, ya que cualquier alteración en estas etapas podría ser un fracaso para el proceso de criopreservación.
- 3.- La edad del canino influye significativamente al momento de la manipulación, toma de muestra y cantidad de muestra obtenida; a menor edad, menor éxito en la recolección de muestra.
- 4.- La época del año en la cual se toma la muestra de semen canino ha demostrado ser más favorable en verano, ya que la temperatura cálida favorece la conservación de semen, y evita el shock térmico que se presenta en estaciones de invierno al exponer al semen a temperaturas inferiores en el medio ambiente.



## VII. RECOMENDACIONES

- 1.- Se sugiere realizar más investigaciones respecto al tema de criopreservación de semen en caninos, pudiendo utilizar la concentración del 5% de glicerol, que fue la más efectiva en razas puras de diferente tamaño y evaluar su eficiencia.
- 2.- La toma y procesamiento de muestra deben hacerse lo más cerca al laboratorio, ya que así se garantiza el mejor manejo y se evita su contaminación durante el traslado.
3. Realizar inseminación artificial con semen criopreservado y evaluar la tasa de fecundidad en las hembras seleccionadas.
- 4.- Realizar inseminaciones con pajuelas que contengan concentraciones mínimas de espermatozoides y evaluar la tasa de fecundidad.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Uribe R, Arango ME, Rendón L, Acevedo CM. Evaluación del semen canino, sometido a congelación con diferentes concentraciones de glicerol como crioprotector. CES Med Vet Zootec [Internet]. 2011. [citado 10 de Julio 2013]; 6 (1): 21-30. Disponible en :  
<http://www.scielo.org.co/pdf/cmvez/v6n1/v6n1a03.pdf>
2. Corti L. Evaluación de la capacidad fecundante del semen congelado de perro (*canis familiaris*), en ovas recuperadas de perras en celo inducido. [Tesis de pregrado]. Valdivia- Chile. Universidad Austral de Chile.; 2003.
3. Restrepo BG, Gómez OJ, Vásquez AN. Criopreservación de semen canino por congelación rápida con glicerol y dimetilformamida. *Revista Lasallista de Investigación*. [Internet]. 2011. [citado 12 de julio 2013]; 8 (2): 9-17. Disponible en:  
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69522607002>
4. Carlotto RG. Efecto del momento de adición del glicerol durante la curva de enfriamiento sobre la calidad espermática durante el proceso de crioconservación de semen canino. [Tesis de pregrado]. Lima- Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2009.
5. Bonilla HC, Ballesteros MR. Evaluación de la capacidad fecundante del semen canino congelado, comparando glicerol, etilenglicol y DMSO como crioprotectores en el diluyente Tris-Glucosa- Yema de Huevo. [Tesis de pregrado]. Bogotá, DC. Universidad de la Salle; 2007.

6. Andrade Martins. Influencia en la calidad espermática de la adición de distintas concentraciones de crioprotectores para la conservación del semen canino. [Tesis doctoral]. Universidad de la Salle; 2007.
7. De los Reyes MS. Congelación de semen. En: Gobello C. Temas de reproducción en caninos y felinos por autores latinoamericanos. Argentina; Gráfica Latina S.A.; 2004. 248p.
8. Cardoso RC, Silva AR, Ochoa DC, Da Silva LD. Criopreservación de semen canino utilizando un extensor de agua de coco con la yema de huevo y tres diferentes concentraciones de glicerol. *Theriogenology*. [Internet]. 2003. [citado el 18 de julio 2013]; 59. (3-4): 743- 751. Disponible en: [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12517378](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12517378)
9. Watson PF. Los últimos acontecimientos y conceptos en la crioconservación de espermatozoides y la valoración de su función post descongelación. En: Watson PF. *La reproducción, la fertilidad y el desarrollo*. 7<sup>ma</sup> ed. Estados Unidos. 1995. p. 871- 891.
10. Provicence CA, Amann RP, Pickett BW, Squires EL. Extensores para la preservación de canino y espermatozoides equinos a 5°C. *Theriogenology*. [Internet]. 1984. [citado 29 de agosto 2013]; 22(4): 409- 415. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0093691X84904618>
11. Pickett, BW; Komareck, RJ. Effect of cold shock and freezing on loss of lipids from spermatozoa. *J. Dairy Sci.* [Internet]. 1996. [citado 29 de agosto 2013]; 50 (5): 753-757. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/17118726\\_Effect\\_of\\_Cold\\_Shock\\_and\\_Freezing\\_on\\_Loss\\_of\\_Lipid\\_from\\_Spermatozoa](https://www.researchgate.net/publication/17118726_Effect_of_Cold_Shock_and_Freezing_on_Loss_of_Lipid_from_Spermatozoa)

12. Gao DY, Liu J, Liu C, McGann LE, Watson PF y colaboradores. Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Human Reprod.* [Internet]. 1995. [citado 10 de abril 2016]; 10 (5): 1109 -1122. Disponible en :  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7657750>
  
13. Fahy GM, Lilley TH, Linsdell H, Meryman HT. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms. *Cryobiology.* [Internet]. 1990. [citado 16 de abril 2016]; 27 (3): 247-268. Disponible en:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2199153>
  
14. De los reyes MS. Uso de la inseminación artificial en los perros. Chile. MEVEPA – Universidad de Chile. Concón. 2002. 15: 4-8.
  
15. Anchoroguy TJ, Rudolph AS, Carpenter JF, Crowe JH. Modes of Interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. En: Corti L. Evaluación de la capacidad fecundante del semen congelado de perro (*canis familiaris*), en ovas recuperadas de perras en celo inducido. [Tesis de pregrado]. Valdivia- Chile. Universidad Austral de Chile.; 2003.
  
16. Dhami A, Sahni K. Evaluation of different cooling rates, equilibration periods and diluents of effects on deep-freezing enzyme leakage and fertility of taurine bull spermatozoa. En: Corti L. Evaluación de la capacidad fecundante del semen congelado de perro (*canis familiaris*), en ovas recuperadas de perras en celo inducido. [Tesis de pregrado]. Valdivia- Chile. Universidad Austral de Chile.; 2003.

17. Holt W. basic aspect of frozen storage semen, animal reproduction science. Elsevier. [Internet]. 2000. [citado el 15 de julio 2016]; 62 (1-3): 3- 22. Disponible en:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10924818>
  
18. Garcia J. y Vila L. Criopreservadores: concepto y manejo. Biología y Clínica Hematológica. [Internet]. 1984. [citado el 25 de julio 2016]; 6(4): 219 - 225. Disponible en:  
<http://bddoc.csic.es:8080/ver/IME/docu/70656.html>
  
19. Boiso I. 2001. Principios básicos criobiología. Revista Iberoamericana de Fertilidad. [Internet]. 1984. [citado el 15 de julio 2015]; 18(4): 127 – 131. Disponible en:  
[http://www.revistafertilidad.org/RecursosWEB/fertilidad/Fert%20Jul\\_Ag01-Ponen3.pdf](http://www.revistafertilidad.org/RecursosWEB/fertilidad/Fert%20Jul_Ag01-Ponen3.pdf)
  
20. Medeiros CM, Forell F, Oliveira AT, Rodríguez JL. Estado actual de la crioconservación de esperma: Por qué no es mejor?. Theriogenology. [Internet]. 2002. [citado el 29 de julio 2013]; 57(1): 327- 344. Disponible en:  
[www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11775978](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11775978)
  
21. Hafez B. Reproducción e inseminación artificial en animales. Mexico. Editorial Mexico. 2002.
  
22. Alamo SD. Crioconservación y viabilidad espermática en la especie canina: utilización de nitrógeno líquido vs ultra congelador de -152° C. [tesis doctoral]. Universidad de las Palmas de Gran Canaria; 2007.

23. Bateman HL. Effects of semen extender composition and cooling methods on canine sperman function and cryo-survival. [Tesis para magister en ciencias]. Ottawa, Canada. Universidad de Guelph; 2001.
24. Silva AR citado por: Valderrama RD, Arango ME, Rendón L, Acevedo Naranjo CM. Evaluación del semen canino, sometido a congelación con diferentes concentraciones de glicerol como crioprotector. CES Med Vet Zootec [Internet]. 2011. [citado 10 de Julio 2013]; 6 (1): 21-30. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/cmvez/v6n1/v6n1a03.pdf>.
25. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol*. [Internet]. 1984. [citado el 10 de abril 2016]; 247 (3): 125 -142. disponible en: <http://ajpcell.physiology.org/content/247/3/C125.short>
26. Ishibashi K, Kuwanhara M, Gu Y, Kageyama Y, Tohsaka A, Suzuki F, Marumo, F. y Sasaki S. Cloning and fuctional. expression of a new water channel abundantly expressed in the testis permeable to water, glycerol and urea. *Journal of Biological Chemistry*. [Internet]. 1997. [citado el 10 de abril 2016]; 272(33): 20782-20786. Disponible en: <http://www.jbc.org/content/272/33/20782.full>
27. Mcgann L. Differing Actions of Penetrating and Nonpenetrating Cryoprotective Agents. *Cryobiology*. [Internet]. 1978. [citado el 14 de abril 2016]; 15(4): 382 – 390. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0011224078900561>
28. Rota A, Milani C, Cabianca G y Martini M. Comparison between glycerol and ethylene glycol for dog sperm cryopreservation, *Theriogenology*. [Internet]. 2006. [citado el 17 de abril 2016]; 65(9): 1848 – 1858. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X05004504>

29. Province CA, Amann RP, Pickett BW, Squires EL. Extenders for preservation of canine and equine spermatozoa at 5°C. *Theriogenology*. [Internet]. 1984. [citado el 27 de julio 2016]; 22(4): 409 – 415. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16725973>
30. Graham JK, Foote RH. Effects of several lipids, fatty acid chain length and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology*. [Internet]. 1987. [citado el 28 de julio 2016]; 24(1):42–52. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3816287>
31. Maxwell WMC, Watson PF. Los recientes progresos en la preservación de semen ovino. Elsevier. [Internet].1996. [citado el 20 agosto 2013]; 42(1): 55-65. Disponible en: <http://www.ingentaconnect.com/content/els/03784320/1996/00000042/00000001/art01544>.
32. Salomon S, Maxwell W. El almacenamiento de semen de carnero. *Ciencia y reproducción animal*. [Internet].2000. [citado 10 de agosto 2013]; 62 (1-3): 77-111. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037843200000155X>
33. Amann RP, Pickett BW. Principios de la criopreservación y una revisión de espermatozoides sementales. *Journal of Equine Veterinary Science*. [Internet].1987. [citado 10 de agosto 2013]; 7(3): 145- 173. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080687800254>

34. Ollero M, Bescos O, Cebrián- Pérez, Muiño- Blanco T. La pérdida de proteínas de la membrana plasmática de los espermatozoides de toro a través del proceso de congelación- descongelación. *Theriogenology*. [Internet].1998. [citado 22 de agosto 2013]; 49(3):547- 555. Disponible en:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X98000065>
35. Gobello G. Ciclo estral canino. En: Wanke M, Gobello C. Reproducción en caninos y felinos domésticos. Buenos Aires- Argentina; Inter médica; 2008. P. 15-30.
36. Anduaga J, Estudio comparativo de la congelación de semen bovino con el dilutor Tris. [Tesis de pregrado]. Lima- Perú. Universidad Agraria La Molina; 1980.
37. Bartlett DJ. Biochemical Characteristics of Dog Semen. *Nature Journal*. [Internet]. 1958. [citado 20 de julio 2013]; 182: 1605 - 1606. Disponible en:  
<http://www.nature.com/nature/journal/v182/n4649/pdf/1821605a0.pdf>.
38. Salomon S, Maxwell WMC. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Science reproduction animal*. [Internet]. 1995. [citado 25de agosto 2013]; 38 (1-2): 1-36. Disponible en:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/037843209401328J>
39. Restrepo BG, Vásquez AN, García EA. Criopreservación de semen canino y su aplicación en la inseminación artificial. *CES Med Vet Zotec* [Internet]. 2011. [citado 10 de Julio 2013]; 4 (2): 119 -129. Disponible en:  
[http://www.revistamvzces.com/revistas/vol4no2/Articulo\\_12.pdf](http://www.revistamvzces.com/revistas/vol4no2/Articulo_12.pdf)



40. Stornelli M, De la Sota R. Fertilidad y supervivencia del semen canino criopreservado. *Analecta Veterinaria*. [Internet] 2006. [citado 18 de octubre 2016]; 25(2): 29 – 38. Disponible en :  
[http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/11194/Documento\\_completo\\_...pdf?sequence=1](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/11194/Documento_completo_...pdf?sequence=1)
41. Fontecha E. Estandarización de un protocolo para la criopreservación de semen canino con congelador programable (CI-8800. Citado por Restrepo BG, Gómez OJ, Vásquez AN. **Criopreservación de semen canino por congelación rápida con glicerol y dimetilformamida.** *Revista Lasallista de Investigación*. [Internet]. 2011. [citado 12 de julio 2013]; 8 (2): 9-17. Disponible en:  
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69522607002>
42. Aguiar PH. Costa ME. Abreu JJ. Abreu CP. Coleta e avaliação de sêmen canino. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*. [Internet].1994. [citado 18 de octubre 2016]; 46(5): 537 – 544. Disponible en:  
<http://www.repositoriobib.ufc.br/000023/00002300.pdf>
43. Feldman E, Nelson R, Díaz O, Arancibia C, citado por el tesista: Corti. A. Evaluación de la capacidad fecundante del semen congelado de perro (*canis familiaris*), en ovas recuperadas de perras en celo inducido. [Tesis de pregrado].Valdivia- Chile. Universidad Austral de Chile.; 2003.
44. Romagnoli S. Canine artificial insemination with fresh, refrigerated and frozen semen. *Proceedings of the Veterinary Sciences Congress*. [Internet]. 2002. [citado 18 de octubre 2016]; 10(12): 167-170. Disponible en:  
<http://horta.0catch.com/congressospcv/18.pdf>

45. Amann R. Reproductive physiology and endocrinology of the dog. Theriogenology. [Internet]. 1986. [citado 8 de octubre 2016]; 10(12): 10-12: 167-170. Disponible en:
46. Silva A, Cardoso R, Uchoa D, Machado L. Effect to tris-buffer, egg yolk and glycerol on canine semen freezing. The veterinary journal. [Internet]. 2002. [citado 18 de octubre 2016]; 10(12): 10-12: 167-170. Disponible en: <http://horta.0catch.com/congressospcv/18.pdf>
47. Oliveira L, Corona M, & Das Neves P. Citado Por: Hernandez D, Carrillo-González D. Aplicación del Test Hipoosmótico (Host) En la Evaluación de calidad seminal en ovinos criollos de pelo colombiano. AICA. [Internet]. 2015. [Citado 10 De Noviembre 2016]; 6: 165-175. Disponible En: [File:///C:/Users/PC/Downloads/AICA2015vv\\_Trabajo023%20\(5\).Pdf](File:///C:/Users/PC/Downloads/AICA2015vv_Trabajo023%20(5).Pdf)
48. Sanchez A, Rubilar J, Gatica R. Uso de la prueba hiposmótica en la evaluación de la fertilidad potencial de semen fresco y congelado. Arch.med.vet [Internet]. 2002. [citado 10 de noviembre 2016]; 34(1): 131 - 134. Disponible en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0301-](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-)
49. Hernández SR. Metodología de la investigación. México: Mc graw-hill; 1997.
50. Rubilar, J. Evaluación de la fertilidad potencial de semen congelado canino. [Tesis de pregrado]. Valdivia - Chile. Universidad Austral de Chile; 1999.
51. Silva AR, Cardoso RC, Uchoa DC, Silva LD. Quality of Canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. Theriogenology. [Internet]. 2003. [citado 10 de noviembre 2016]; 59:821-829. Disponible en :

- [https://www.researchgate.net/profile/Lucia\\_Silva3/publication/10960574\\_Quality\\_of\\_canine\\_semen\\_submitted\\_to\\_single\\_or\\_fractionated\\_glycerol\\_addition\\_during\\_the\\_freezing\\_process/links/559d8d9808aeb45d1715cf79.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Lucia_Silva3/publication/10960574_Quality_of_canine_semen_submitted_to_single_or_fractionated_glycerol_addition_during_the_freezing_process/links/559d8d9808aeb45d1715cf79.pdf)
52. Díaz OH, Arancibia C. Calificación de la fertilidad potencial de los animales domésticos. Citado por: Cox MAF. Caracterización Andrológica de potros de raza Chilota. [Tesis de pregrado]. Valdivia - Chile. Universidad Austral de Chile. 2005.
53. Rota A, Strom B, Linde - Frosberg C. Effects of seminal plasma and three extender on canine semen stored at 4°C. *Theriogenology*. [Internet].1995. [citado 05 de noviembre 2016]; 44(6):885 - 900. Disponible en : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16727784>
54. England G. Semen quality in dogs and the influence of a short-interval second ejaculation. *Theriogenology*. [Internet].1999. [citado 05 de noviembre 2016]; 52(6):981 - 986. Disponible en : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10735105>
55. Feldman E, Nelson R. Endocrinología y Reproducción Canina y Felina. Ed.Inter.-Médica, S.A.I.C.I. Buenos Aires. 1218p. 2007.
56. England G, Allen W. Factors affecting the viability of canine spermatozoa I. Potential influences during processing for artificial insemination. *Theriogenology*. [Internet].1992. [citado 07 de octubre 2016]; 37(2):363-371. Disponible en : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0093691X9290194V>
57. Sánchez A. Inseminación artificial en perros. IV Curso Internacional de Medicina y Cirugía en Pequeños Animales. MEVEPA. Citado por: Sánchez A. Rubilar J. Obtención de cachorros mediante inseminación artificial con semen

canino refrigerado. Primera descripción en Chile. Arch. med. vet. [Internet].2001. [citado 07 de octubre 2016]; 33(1):105 - 110. Disponible en : [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0301-732X2001000100012](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X2001000100012)

58. Gómez V, Miglori L. Protocolo para la evaluación de semen en rumiantes. Cátedra Reproducción Animal Facultad de Cs. Veterinarias. UNLP. 2010.

## IX. ANEXOS

Anexo 1:

Cuadro 1: Alimentación que reciben los caninos durante el proceso de investigación.

RAZAS	TIPO DE DIETA QUE RECIBEN LOS CANINOS				
	Alimento comercial 1 (Súper Premium)	Alimento comercial 2 (Premium )	Alimento comercial 3 (Mantenimiento)	Dieta mixta (Alimento comercial y casero)	Sólo comida casera
Labrador	Si	No	No	No	No
Cx. Ovejero	No	No	No	Si	No
Yorshire 1	No	Si	No	No	No
Chihuahua 1	Si	No	No	No	No
Schnauzer	No	No	No	Si	No
Chihuahua 2	Si	No	No	No	No
Pastor belga	No	Si	No	No	No
Cx. Pastor A.	No	No	No	Si	No
Yorshire 2	No	Si	No	No	No
Shihtzu	No	No	No	Si	No
Mestizo 1	No	No	No	No	Si
Mestizo 2	No	No	Si	No	No

Anexo 2:

Cuadro 2: Caninos pre selección para Crioconservación de semen canino.

Razas	Cantidad en ml de 2da fracción	Motilidad progresiva (%)	Concentración espermática		Edad en años	Se acepta para Evaluación
			Número Esper. contados	Esp. x 10 <sup>6</sup> ml		
Labrador	1.7	80	122	610	5	NO
Cx. Ovejero	1.5	85	109	545	3	NO
Yorshire 1	0.7	85	130	650	5	NO
Chihuahua 1	0.4	80	111	555	4	NO
Schnauzer	1.2	90	95	475	3	NO
Chihuahua 2	0.5	90	75	375	5	NO
Pastor belga	1.8	70	140	700	2.4	NO
Cx. Pastor A.	1.4	85	120	600	2	NO
Yorshire 2	0.7	95	220	1 100	3	SI
Shihtzu	0.8	95	216	1 080	2.5	SI
Mestizo 1	1.5	95	231	1 155	4	SI
Mestizo 2	1.7	95	239	1 195	2.7	SI

### Anexo 3

Cuadro 3: Lectura de pajillas post congelación a tratamiento con glicerol al 4% a paciente Yorkshire de 3 años

N° pajilla	Prueba de Host		Tinción eosina Nigrosina		Concentración espermática		Motilidad progresiva %
	Esp. Contados	%	Esp. contados	%	Esp. contados	10 <sup>6</sup> Esp /ml	
1	118		84		106		65
2	120		87		108		65
3	118		85		108		65
4	119		84		109		65
Promedio	118.75	59.37	85	42.5	107.75	540	65

### Anexo 4

Cuadro 4: Lectura de pajillas post congelación a tratamiento con glicerol al 5% a paciente Yorkshire de 3 años

N° pajilla	Prueba de host		Tinción eosina Nigrosina		Concentración espermática		Motilidad progresiva %
	Esp. contados	%	Esp. contados	%	Esp. contados	10 <sup>6</sup> Esp /ml	
1	148		139		162		85
2	147		141		163		85
3	148		141		162		85
4	148		140		164		85
Promedio	147.75	73.87	140.25	70.12	162.75	815	85

### Anexo 5

Cuadro 5: Lectura de pajillas post congelación a tratamiento con glicerol al 6% a paciente Yorkshire de 3 años

N° pajilla	Prueba de host		Tinción eosina Nigrosina		Concentración espermática		Motilidad progresiva %
	Esp. Contados	%	Esp. contados	%	Esp. contados	10 <sup>6</sup> Esp /ml	
1	68		59		87		30
2	65		57		87		30
3	68		58		85		30
4	68		59		86		30
Promedio	67.25	33.62	58.25	29.12	86.25	430	30

## Anexo 6

Cuadro 6: Lectura de pajillas post congelación a tratamiento con glicerol al 4% a paciente mestizo 1

N° pajilla	Prueba de host		Tinción eosina Nigrosina		Concentración espermática		Motilidad progresiva %
	Esp. Contados	%	Esp. contados	%	Esp. contados	10 <sup>6</sup> Esp /ml	
1	134		93		109		75
2	135		93		111		75
3	134		95		111		75
4	133		93		110		75
Promedio	134	67	93.5	46.75	110.25	550	75

## Anexo 7

Cuadro: Lectura de pajillas post congelación a tratamiento con glicerol al 5 % a paciente mestizo 1

N° pajilla	Prueba de host		Tinción eosina Nigrosina		Concentración espermática		Motilidad progresiva %
	Esp. Contados	%	Esp. contados	%	Esp. contados	10 <sup>6</sup> Esp /ml	
1	162		151		175		85
2	160		153		177		85
3	160		153		177		85
4	161		152		176		85
Promedio	160.75	80.37	152.25	76.12	176.25	880	85

## Anexo 8

Cuadro: Lectura de pajillas post congelación a tratamiento con glicerol al 6 % a paciente mestizo 1

N° pajilla	Prueba de host		Tinción eosina Nigrosina		Concentración espermática		Motilidad progresiva %
	Esp. Contados	%	Esp. contados	%	Esp. contados	10 <sup>6</sup> Esp /ml	
1	118		84		106		65
2	120		87		108		65
3	118		85		108		65
4	119		84		109		65
Promedio	118.75	59.37	85	42.5	107.75	540	65



## Anexo 9

Cuadro 9: Lectura de pajillas post congelación a tratamiento con glicerol al 4 % a paciente Shih tzu

N° pajilla	Prueba de host		Tinción eosina Nigrosina		Concentración espermática		Motilidad progresiva %
	Esp. Contados	%	Esp. contados	%	Esp. contados	10 <sup>6</sup> Esp /ml	
1	127		91		101		75
2	127		93		102		75
3	128		93		102		75
4	128		92		102		75
Promedio	127.5	63.75	92.25	46.12	101.75	510	75

## Anexo 10

Cuadro10: Lectura de pajillas post congelación a tratamiento con glicerol al 5 % a paciente Shih tzu

N° pajilla	Prueba de host		Tinción eosina Nigrosina		Concentración espermática		Motilidad progresiva %
	Esp. Contados	%	Esp. contados	%	Esp. contados	10 <sup>6</sup> Esp /ml	
1	154		136		169		85
2	155		136		168		85
3	155		138		168		85
4	154		136		168		85
Promedio	154.5	77.25	136.5	68.25	168.25	840	85

## Anexo 11

Cuadro11: Lectura de pajillas post congelación a tratamiento con glicerol al 6% a paciente Shih tzu

N° pajilla	Prueba de host		Tincion eosina Nigrosina		Concentración espermática		Motilidad progresiva %
	Esp. Contados	%	Esp. contados	%	Esp. contados	10 <sup>6</sup> Esp /ml	
1	72		41		78		30
2	71		43		80		30
3	71		43		80		30
4	71		43		80		30
Promedio	71.25	35.62	42.5	21.25	79.5	400	30

## Anexo 12

Cuadro12: Lectura de pajillas post congelación a tratamiento con glicerol al 4% a paciente mestizo 2

N° pajilla	Prueba de host		Tinción eosina Nigrosina		Concentración espermática		Motilidad progresiva %
	Esp. Contados	%	Esp. contados	%	Esp. contados	10 <sup>6</sup> Esp /ml	
1	145		102		137		85
2	144		104		136		85
3	144		104		136		85
4	144		104		136		85
Promedio	144.25	72.12	103.5	51.75	136.25	680	85

## Anexo 13

Cuadro13: Lectura de pajillas post congelación a tratamiento con glicerol al 5% a paciente mestizo 2

N° pajilla	Prueba de host		Tinción eosina Nigrosina		Concentración espermática		Motilidad progresiva %
	Esp. Contados	%	Esp. contados	%	Esp. contados	10 <sup>6</sup> Esp /ml	
1	169		169		182		95
2	169		172		184		95
3	170		172		182		95
4	169		172		182		95
Promedio	169.25	84.62	171.25	85.62	182.5	915	95

## Anexo 14

Cuadro14: Lectura de pajillas post congelación a tratamiento con glicerol al 6% a paciente mestizo 2

N° pajilla	Prueba de host		Tinción eosina Nigrosina		Concentración espermática		Motilidad progresiva %
	Esp. Contados	%	Esp. contados	%	Esp. contados	10 <sup>6</sup> Esp /ml	
1	81		79		83		45
2	80		81		83		45
3	80		81		83		45
4	82		81		85		45
Promedio	80.75	40.37	80.5	40.25	83.5	420	45

## Anexo 15

Cuadro 15: Temperatura de Pachacamac durante el mes de febrero del 2016

Perú Tiempo meteorológ...		Pachacamac, Perú Tiempo meteorológicc			22°C	
Ahora	Fin de semana	Ampliado	Mes	SATÉLITE		
enero 2016		Vista:	febrero	2016	marzo 2016	
DO. 31/01 Temp. real 30°/24° Media histórica 28°/19°	LU. 01/02 Temp. real 28°/23° Media histórica 28°/19°	MA. 02/02 Temp. real 29°/24° Media histórica 28°/19°	MI. 03/02 Temp. real 29°/24° Media histórica 28°/19°	JU. 04/02 Temp. real 28°/24° Media histórica 28°/19°	VI. 05/02 Temp. real 30°/23° Media histórica 28°/19°	SÁ. 06/02 Temp. real 29°/23° Media histórica 28°/19°
DO. 07/02 Temp. real 29°/22° Media histórica 28°/19°	LU. 08/02 Temp. real 26°/23° Media histórica 28°/19°	MA. 09/02 Temp. real 29°/23° Media histórica 28°/19°	MI. 10/02 Temp. real 31°/23° Media histórica 28°/19°	JU. 11/02 Temp. real 29°/23° Media histórica 28°/19°	VI. 12/02 Temp. real 29°/23° Media histórica 28°/19°	SÁ. 13/02 Temp. real 29°/23° Media histórica 28°/19°
DO. 14/02 Temp. real 28°/23° Media histórica 28°/19°	LU. 15/02 Temp. real 28°/23° Media histórica 28°/19°	MA. 16/02 Temp. real 29°/22° Media histórica 28°/19°	MI. 17/02 Temp. real 30°/23° Media histórica 28°/19°	JU. 18/02 Temp. real 29°/23° Media histórica 28°/19°	VI. 19/02 Temp. real 29°/23° Media histórica 28°/19°	SÁ. 20/02 Temp. real 31°/23° Media histórica 28°/19°
DO. 21/02 Temp. real 30°/23° Media histórica 28°/19°	LU. 22/02 Temp. real 29°/19° Media histórica 28°/19°	MA. 23/02 Temp. real 30°/23° Media histórica 28°/19°	MI. 24/02 Temp. real 28°/24° Media histórica 28°/19°	JU. 25/02 Temp. real 31°/24° Media histórica 28°/19°	VI. 26/02 Temp. real 32°/24° Media histórica 28°/19°	SÁ. 27/02 Temp. real 31°/23° Media histórica 28°/19°



## Anexo 16

Cuadro 16: Temperatura de Pachacamac durante el mes de marzo del 2016

Perú Tiempo meteorológ...		Pachacamac, Perú Tiempo meteorológicc			22°C	
Ahora	Fin de semana	Ampliado	Mes	SATÉLITE		
febrero 2016		Vista:	marzo	2016	abril 2016	
DO. 28/02 Temp. real 31°/24° Media histórica 28°/19°	LU. 29/02 Temp. real 27°/23° Media histórica 28°/19°	MA. 01/03 Temp. real 30°/23° Media histórica 28°/19°	MI. 02/03 Temp. real 29°/22° Media histórica 28°/19°	JU. 03/03 Temp. real 29°/22° Media histórica 28°/19°	VI. 04/03 Temp. real 29°/22° Media histórica 28°/19°	SÁ. 05/03 Temp. real 29°/23° Media histórica 28°/19°
DO. 06/03 Temp. real 29°/23° Media histórica 28°/19°	LU. 07/03 Temp. real 30°/23° Media histórica 28°/19°	MA. 08/03 Temp. real 29°/22° Media histórica 28°/19°	MI. 09/03 Temp. real 28°/23° Media histórica 28°/19°	JU. 10/03 Temp. real 29°/22° Media histórica 28°/19°	VI. 11/03 Temp. real 29°/23° Media histórica 28°/19°	SÁ. 12/03 Temp. real 29°/22° Media histórica 28°/19°
DO. 13/03 Temp. real 29°/22° Media histórica 28°/19°	LU. 14/03 Temp. real 30°/22° Media histórica 28°/19°	MA. 15/03 Temp. real 29°/13° Media histórica 28°/19°	MI. 16/03 Temp. real 27°/21° Media histórica 28°/19°	JU. 17/03 Temp. real 28°/22° Media histórica 28°/18°	VI. 18/03 Temp. real 28°/22° Media histórica 28°/18°	SÁ. 19/03 Temp. real 28°/22° Media histórica 28°/18°
DO. 20/03 Temp. real 29°/22° Media histórica 28°/18°	LU. 21/03 Temp. real 30°/22° Media histórica 28°/18°	MA. 22/03 Temp. real 29°/22° Media histórica 28°/18°	MI. 23/03 Temp. real 27°/21° Media histórica 28°/18°	JU. 24/03 Temp. real 28°/22° Media histórica 28°/18°	VI. 25/03 Temp. real 27°/22° Media histórica 28°/18°	SÁ. 26/03 Temp. real 30°/21° Media histórica 28°/18°



## Anexo 17

Cuadro 17: Temperatura de Pachacamac durante el mes de abril del 2016

Perú Tiempo meteorológ...		Pachacamac, Perú Tiempo meteorológicc		22°C		
Ahora	Fin de semana	Ampliado	Mes	SATÉLITE		
marzo 2016		Vista:  	abril	2016	mayo 2016	
DO. 27/03 Temp. real 29°/22° Media histórica 27°/18°	LU. 28/03 Temp. real 29°/22° Media histórica 27°/18°	MA. 29/03 Temp. real 29°/22° Media histórica 27°/18°	MI. 30/03 Temp. real 30°/22° Media histórica 27°/18°	JU. 31/03 Temp. real 29°/21° Media histórica 27°/18°	VI. 01/04 Temp. real 29°/23° Media histórica 27°/18°	SÁ. 02/04 Temp. real 27°/22° Media histórica 27°/18°
DO. 03/04 Temp. real 29°/22° Media histórica 27°/18°	LU. 04/04 Temp. real 29°/21° Media histórica 27°/18°	MA. 05/04 Temp. real 29°/21° Media histórica 27°/18°	MI. 06/04 Temp. real 26°/21° Media histórica 27°/17°	JU. 07/04 Temp. real 27°/20° Media histórica 27°/17°	VI. 08/04 Temp. real 26°/21° Media histórica 27°/17°	SÁ. 09/04 Temp. real 26°/21° Media histórica 27°/17°
DO. 10/04 Temp. real 26°/21° Media histórica 27°/17°	LU. 11/04 Temp. real 27°/21° Media histórica 27°/17°	MA. 12/04 Temp. real 27°/21° Media histórica 27°/17°	MI. 13/04 Temp. real 26°/19° Media histórica 27°/17°	JU. 14/04 Temp. real 27°/19° Media histórica 27°/17°	VI. 15/04 Temp. real 26°/20° Media histórica 27°/17°	SÁ. 16/04 Temp. real 26°/20° Media histórica 26°/17°
DO. 17/04 Temp. real 26°/21° Media histórica 26°/17°	LU. 18/04 Temp. real 25°/20° Media histórica 26°/17°	MA. 19/04 Temp. real 26°/20° Media histórica 26°/17°	MI. 20/04 Temp. real 25°/19° Media histórica 26°/17°	JU. 21/04 Temp. real 23°/19° Media histórica 26°/17°	VI. 22/04 Temp. real 23°/19° Media histórica 26°/17°	SÁ. 23/04 Temp. real 23°/19° Media histórica 26°/17°



## Anexo 18

Cuadro 18: Temperatura de Pachacamac durante el mes de mayo del 2016

Perú Tiempo meteorológ...		Pachacamac, Perú Tiempo meteorológicc		22°C		
Ahora	Fin de semana	Ampliado	Mes	SATÉLITE		
abril 2016		Vista:  	mayo	2016	junio 2016	
DO. 01/05 Temp. real 27°/18° Media histórica 24°/16°	LU. 02/05 Temp. real 25°/19° Media histórica 24°/16°	MA. 03/05 Temp. real 25°/19° Media histórica 24°/16°	MI. 04/05 Temp. real 23°/18° Media histórica 24°/16°	JU. 05/05 Temp. real 25°/19° Media histórica 24°/16°	VI. 06/05 Temp. real 24°/17° Media histórica 24°/16°	SÁ. 07/05 Temp. real 25°/18° Media histórica 24°/16°
DO. 08/05 Temp. real 24°/18° Media histórica 24°/16°	LU. 09/05 Temp. real 26°/18° Media histórica 24°/16°	MA. 10/05 Temp. real 26°/18° Media histórica 24°/16°	MI. 11/05 Temp. real 25°/20° Media histórica 23°/16°	JU. 12/05 Temp. real 22°/18° Media histórica 23°/16°	VI. 13/05 Temp. real 23°/18° Media histórica 23°/16°	SÁ. 14/05 Temp. real 23°/18° Media histórica 23°/16°
DO. 15/05 Temp. real 23°/17° Media histórica 23°/16°	LU. 16/05 Temp. real 23°/18° Media histórica 23°/16°	MA. 17/05 Temp. real 23°/18° Media histórica 23°/15°	MI. 18/05 Temp. real 22°/18° Media histórica 23°/15°	JU. 19/05 Temp. real 22°/18° Media histórica 23°/15°	VI. 20/05 Temp. real 21°/18° Media histórica 23°/15°	SÁ. 21/05 Temp. real 21°/18° Media histórica 23°/15°
DO. 22/05 Temp. real 21°/18° Media histórica 22°/15°	LU. 23/05 Temp. real 22°/18° Media histórica 22°/15°	MA. 24/05 Temp. real 23°/18° Media histórica 22°/15°	MI. 25/05 Temp. real 21°/18° Media histórica 22°/15°	JU. 26/05 Temp. real 21°/17° Media histórica 22°/15°	VI. 27/05 Temp. real 22°/17° Media histórica 22°/15°	SÁ. 28/05 Temp. real 22°/18° Media histórica 22°/15°



Anexo 19

Cuadro 19: Temperatura de Pachacamac durante el mes de junio del 2016

Perú Tiempo meteorológ...		Pachacamac, Perú Tiempo meteorológicc		22°C		
Ahora	Fin de semana	Ampliado	Mes	SATÉLITE		
← mayo 2016		Vista:  	junio	2016	julio 2016 →	
DO. 29/05 Temp. real 21°/16° Media histórica 22°/15°	LU. 30/05 Temp. real 21°/16° Media histórica 22°/15°	MA. 31/05 Temp. real 20°/17° Media histórica 22°/15°	MI. 01/06 Temp. real 19°/16° Media histórica 21°/14°	JU. 02/06 Temp. real 21°/17° Media histórica 21°/14°	VI. 03/06 Temp. real 20°/16° Media histórica 21°/14°	SÁ. 04/06 Temp. real 19°/17° Media histórica 21°/14°
DO. 05/06 Temp. real 21°/16° Media histórica 21°/14°	LU. 06/06 Temp. real 21°/16° Media histórica 21°/14°	MA. 07/06 Temp. real 20°/14° Media histórica 21°/14°	MI. 08/06 Temp. real 20°/17° Media histórica 21°/14°	JU. 09/06 Temp. real 19°/17° Media histórica 21°/14°	VI. 10/06 Temp. real 19°/17° Media histórica 21°/14°	SÁ. 11/06 Temp. real 21°/17° Media histórica 20°/14°
DO. 12/06 Temp. real 22°/17° Media histórica 20°/14°	LU. 13/06 Temp. real 20°/16° Media histórica 20°/14°	MA. 14/06 Temp. real 21°/14° Media histórica 20°/14°	MI. 15/06 Temp. real 21°/17° Media histórica 20°/14°	JU. 16/06 Temp. real 21°/17° Media histórica 19°/14°	VI. 17/06 Temp. real 21°/17° Media histórica 19°/14°	SÁ. 18/06 Temp. real 20°/16° Media histórica 19°/14°
DO. 19/06 Temp. real 21°/17° Media histórica 19°/14°	LU. 20/06 Temp. real 21°/16° Media histórica 19°/14°	MA. 21/06 Temp. real 19°/15° Media histórica 19°/14°	MI. 22/06 Temp. real 19°/16° Media histórica 19°/14°	JU. 23/06 Temp. real 18°/16° Media histórica 19°/14°	VI. 24/06 Temp. real 21°/16° Media histórica 19°/14°	SÁ. 25/06 Temp. real 21°/15° Media histórica 19°/14°



Anexo 20

Cuadro 20: Temperatura de Pachacamac durante el mes de julio del 2016

Perú Tiempo meteorológ...		Pachacamac, Perú Tiempo meteorológicc		22°C		
Ahora	Fin de semana	Ampliado	Mes	SATÉLITE		
← junio 2016		Vista:  	julio	2016	agosto 2016 →	
DO. 26/06 Temp. real 20°/17° Media histórica 19°/14°	LU. 27/06 Temp. real 19°/17° Media histórica 19°/14°	MA. 28/06 Temp. real 19°/16° Media histórica 19°/14°	MI. 29/06 Temp. real 19°/16° Media histórica 19°/14°	JU. 30/06 Temp. real 20°/17° Media histórica 19°/14°	VI. 01/07 Temp. real 21°/17° Media histórica 19°/14°	SÁ. 02/07 Temp. real 21°/17° Media histórica 19°/14°
DO. 03/07 Temp. real 20°/17° Media histórica 19°/14°	LU. 04/07 Temp. real 19°/17° Media histórica 19°/14°	MA. 05/07 Temp. real 19°/17° Media histórica 19°/14°	MI. 06/07 Temp. real 19°/17° Media histórica 19°/14°	JU. 07/07 Temp. real 19°/17° Media histórica 19°/14°	VI. 08/07 Temp. real 19°/17° Media histórica 19°/14°	SÁ. 09/07 Temp. real 20°/16° Media histórica 19°/14°
DO. 10/07 Temp. real 21°/17° Media histórica 19°/14°	LU. 11/07 Temp. real 20°/17° Media histórica 19°/14°	MA. 12/07 Temp. real 20°/16° Media histórica 19°/14°	MI. 13/07 Temp. real 20°/17° Media histórica 19°/14°	JU. 14/07 Temp. real 19°/17° Media histórica 19°/14°	VI. 15/07 Temp. real 19°/16° Media histórica 19°/14°	SÁ. 16/07 Temp. real 19°/16° Media histórica 19°/14°
DO. 17/07 Temp. real 19°/16° Media histórica 19°/13°	LU. 18/07 Temp. real 18°/16° Media histórica 19°/13°	MA. 19/07 Temp. real 19°/15° Media histórica 19°/13°	MI. 20/07 Temp. real 19°/16° Media histórica 19°/13°	JU. 21/07 Temp. real 18°/16° Media histórica 19°/13°	VI. 22/07 Temp. real 21°/15° Media histórica 19°/13°	SÁ. 23/07 Temp. real 18°/14° Media histórica 19°/13°



## Anexo 21

Cuadro 21 Temperatura de Pachacamac durante el mes de agosto del 2016

Perú Tiempo meteorológ...		Pachacamac, Perú Tiempo meteorológicc		22°C		
Ahora	Fin de semana	Ampliado	Mes	SATÉLITE		
← julio 2016		Vista:  	agosto	2016	septiembre 2016 →	
DO. 31/07 Temp. real 20°/16° Media histórica 19°/13°	LU. 01/08 Temp. real 20°/16° Media histórica 19°/13°	MA. 02/08 Temp. real 20°/16° Media histórica 19°/13°	MI. 03/08 Temp. real 19°/16° Media histórica 19°/13°	JU. 04/08 Temp. real 20°/16° Media histórica 19°/13°	VI. 05/08 Temp. real 20°/16° Media histórica 19°/13°	SÁ. 06/08 Temp. real 19°/16° Media histórica 19°/13°
DO. 07/08 Temp. real 18°/16° Media histórica 19°/13°	LU. 08/08 Temp. real 19°/16° Media histórica 19°/13°	MA. 09/08 Temp. real 20°/16° Media histórica 19°/13°	MI. 10/08 Temp. real 20°/15° Media histórica 19°/13°	JU. 11/08 Temp. real 18°/15° Media histórica 19°/13°	VI. 12/08 Temp. real 18°/15° Media histórica 19°/13°	SÁ. 13/08 Temp. real 20°/16° Media histórica 19°/13°
DO. 14/08 Temp. real 19°/16° Media histórica 19°/13°	LU. 15/08 Temp. real 19°/15° Media histórica 19°/13°	MA. 16/08 Temp. real 19°/16° Media histórica 19°/13°	MI. 17/08 Temp. real 19°/16° Media histórica 19°/13°	JU. 18/08 Temp. real 20°/16° Media histórica 19°/13°	VI. 19/08 Temp. real 18°/16° Media histórica 19°/13°	SÁ. 20/08 Temp. real 18°/16° Media histórica 19°/13°
DO. 21/08 Temp. real 21°/16° Media histórica 19°/13°	LU. 22/08 Temp. real 22°/16° Media histórica 19°/13°	MA. 23/08 Temp. real 19°/16° Media histórica 19°/13°	MI. 24/08 Temp. real 19°/16° Media histórica 19°/13°	JU. 25/08 Temp. real 19°/16° Media histórica 19°/13°	VI. 26/08 Temp. real 19°/16° Media histórica 19°/13°	SÁ. 27/08 Temp. real 18°/15° Media histórica 19°/13°



## Anexo 22

Cuadro 22: Temperatura de Pachacamac durante el mes de setiembre del 2016

Perú Tiempo meteorológ...		Pachacamac, Perú Tiempo meteorológicc		22°C		
Ahora	Fin de semana	Ampliado	Mes	SATÉLITE		
← agosto 2016		Vista:  	septiembre	2016	octubre 2016 →	
DO. 28/08 Temp. real 23°/16° Media histórica 19°/13°	LU. 29/08 Temp. real 21°/15° Media histórica 19°/13°	MA. 30/08 Temp. real 19°/16° Media histórica 19°/13°	MI. 31/08 Temp. real 18°/15° Media histórica 19°/13°	JU. 01/09 Temp. real 19°/16° Media histórica 19°/13°	VI. 02/09 Temp. real 21°/15° Media histórica 19°/13°	SÁ. 03/09 Temp. real 19°/16° Media histórica 19°/13°
DO. 04/09 Temp. real 18°/15° Media histórica 19°/13°	LU. 05/09 Temp. real 18°/16° Media histórica 19°/13°	MA. 06/09 Temp. real 19°/16° Media histórica 19°/13°	MI. 07/09 Temp. real 21°/16° Media histórica 19°/13°	JU. 08/09 Temp. real 19°/16° Media histórica 19°/13°	VI. 09/09 Temp. real 21°/16° Media histórica 19°/13°	SÁ. 10/09 Temp. real 21°/16° Media histórica 19°/13°
DO. 11/09 Temp. real 20°/16° Media histórica 19°/13°	LU. 12/09 Temp. real 19°/16° Media histórica 19°/13°	MA. 13/09 Temp. real 21°/16° Media histórica 19°/13°	MI. 14/09 Temp. real 21°/16° Media histórica 19°/13°	JU. 15/09 Temp. real 19°/16° Media histórica 20°/14°	VI. 16/09 Temp. real 19°/16° Media histórica 20°/14°	SÁ. 17/09 Temp. real 22°/16° Media histórica 20°/14°
DO. 18/09 Temp. real 20°/17° Media histórica 20°/14°	LU. 19/09 Temp. real 21°/16° Media histórica 20°/14°	MA. 20/09 Temp. real 21°/16° Media histórica 20°/14°	MI. 21/09 Temp. real 19°/16° Media histórica 20°/14°	JU. 22/09 Temp. real 21°/16° Media histórica 20°/14°	VI. 23/09 Temp. real 20°/16° Media histórica 20°/14°	SÁ. 24/09 Temp. real 21°/17° Media histórica 20°/14°

## Anexo 22

Cuadro 22: Temperatura de Pachacamac durante el mes de setiembre del 2016

Perú Tiempo meteorológ...		Pachacamac, Perú Tiempo meteorológicc		22°C		
Ahora	Fin de semana	Ampliado	Mes	SATÉLITE		
septiembre 2016		Vista:  	octubre	2016	noviembre 2016	
DO. 25/09 Temp. real 20°/16° Media histórica 20°/14°	LU. 26/09 Temp. real 21°/17° Media histórica 21°/14°	MA. 27/09 Temp. real 21°/17° Media histórica 21°/14°	MI. 28/09 Temp. real 22°/17° Media histórica 21°/14°	JU. 29/09 Temp. real 20°/17° Media histórica 21°/14°	VI. 30/09 Temp. real 21°/17° Media histórica 21°/14°	SÁ. 01/10 Temp. real 21°/17° Media histórica 21°/14°
DO. 02/10 Temp. real 22°/17° Media histórica 21°/14°	LU. 03/10 Temp. real 21°/17° Media histórica 21°/14°	MA. 04/10 Temp. real 20°/17° Media histórica 21°/14°	MI. 05/10 Temp. real 20°/17° Media histórica 21°/14°	JU. 06/10 Temp. real 21°/17° Media histórica 21°/14°	VI. 07/10 Temp. real 22°/16° Media histórica 21°/14°	SÁ. 08/10 Temp. real 22°/16° Media histórica 21°/14°
DO. 09/10 Temp. real 21°/17° Media histórica 21°/14°	LU. 10/10 Temp. real 18°/18° Media histórica 21°/14°	MA. 11/10 Temp. real 22°/18° Media histórica 21°/14°	MI. 12/10 Temp. real 23°/17° Media histórica 21°/14°	JU. 13/10 Temp. real 22°/17° Media histórica 21°/14°	VI. 14/10 Temp. real 23°/17° Media histórica 21°/14°	SÁ. 15/10 Temp. real 21°/16° Media histórica 21°/14°
DO. 16/10 Temp. real 23°/17° Media histórica 22°/14°	LU. 17/10 Temp. real 22°/15° Media histórica 22°/14°	MA. 18/10 Temp. real 23°/16° Media histórica 22°/14°	MI. 19/10 Temp. real 21°/17° Media histórica 22°/14°	JU. 20/10 Temp. real 22°/17° Media histórica 22°/14°	VI. 21/10 Temp. real 23°/17° Media histórica 22°/14°	SÁ. 22/10 Temp. real 22°/16° Media histórica 22°/14°