



Facultad de Ciencias Veterinarias y Biológicas

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

“CARACTERIZACION BÁSICA Y FUNCIONAL DEL SEMEN DEL
PERRO SIN PELO DEL PERU”

Tesis

Para optar el Título Profesional de:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

CARLOS YONATHAN CHALLCO SALAS

Bachiller en Medicina Veterinaria y Zootecnia

LIMA – PERU

2019

Acta de Sustentación de Tesis

Siendo las 17:00 horas del 22 de marzo de 2019, en el Auditorio – Campus Villa I, bajo la presencia del jurado examinador nombrado por **Resolución Directoral Académica de Carrera N° 013-DACMVZ-DAFCVB-U. CIENTÍFICA-2019**, presidido por el Dr. César Aquiles Lázaro De La Torre, Mg. Jorge Luis Vilela Velarde, Mg. Boris Lira Mejía y el Dr. Alexei Santiani Acosta como Director – Observador. Se procedió en acto público a la sustentación de la tesis **“CARACTERIZACIÓN BÁSICA Y FUNCIONAL DEL SEMEN DEL PERRO SIN PELO DEL PERÚ”**.

El presidente concedió el uso de la palabra al Bachiller en Medicina Veterinaria y Zootecnia **Challco Salas Carlos Yonathan**, para la sustentación de su tesis. Luego de la exposición, el bachiller absolvió las preguntas del Jurado y del público asistente.

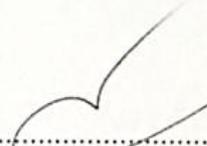
El Jurado acordó otorgarle la nota de:

Dieciacho (18)

El presidente del Jurado dio por culminado el acto de sustentación y levantó la sesión a las 18:00hrs.


.....
Dr. César Aquiles Lázaro De La Torre
Presidente


.....
Mg. Jorge Luis Vilela Velarde
Miembro


.....
Mg. Boris Lira Mejía
Miembro


.....
Dr. Alexei Santiani Acosta
Director - Observador

002-2019

T / (05) 05 6400
opción 2
www.cientifica.edu.pe

Campus
Taramentana Sur
Km 19 - Lima 42

DEDICATORIA:

Todo esto lo logre gracias al apoyo incondicional de mi tío Valerio Salas y a mi otro tío que desde el cielo estoy seguro que me cuida y apoya en todo momento, al esfuerzo de mis queridos padres: Modesta y Bonifacio, ya que todo se lo debo a ellos. También mencionar al señor Ermano Manieron por sus palabras que siempre me motivaban a seguir adelante.

AGRADECIMIENTO:

Agradecer a mi tío Valerio por su incansable insistencia para que pueda terminar rápido la tesis.

Agradecer a mi director de tesis Dr. M.V. Alexei Santiani, por toda la paciencia que me tuvo en este proceso de realizar la tesis, por ayudarme y resolver todas las dudas que tuve en esta etapa de mi vida.

Agradecer a Dios, para que me siga guiando por este buen camino que el eligió para mí.

ÍNDICE GENERAL

| | Pag. |
|--|------|
| RESUMEN..... | 10 |
| ABSTRACT..... | 11 |
| I. INTRODUCCIÓN..... | 12 |
| II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA..... | 14 |
| 2.1 Historia del perro sin pelo del Perú..... | 14 |
| a. Estándar del perro sin pelo del Perú..... | 15 |
| b. Importancia del perro sin pelo del Perú..... | 17 |
| 2.2 Anatomía del aparato reproductor del canino macho..... | 17 |
| 2.3. Fisiología de la reproducción del macho..... | 18 |
| 2.3.1 Espermatogénesis..... | 19 |
| 2.3.2 Transporte del semen..... | 20 |
| 2.3.3 Eyaculación..... | 20 |
| 2.4 Métodos de recolección de semen..... | 20 |
| 2.4.1 Manipulación digital..... | 20 |
| 2.4.2 Electro eyaculación..... | 20 |
| 2.4.3 Vagina artificial..... | 21 |
| 2.5 Semen del perro..... | 21 |
| 2.5.1 Características y parámetros de evaluación básica..... | 22 |
| a. Volumen..... | 22 |
| b. Color..... | 22 |
| c. Olor..... | 22 |
| d. pH..... | 22 |
| e. Motilidad..... | 22 |
| f. Morfología..... | 23 |
| g. Concentración espermática..... | 24 |
| 2.5.2 Características y evaluación de la funcionalidad..... | 24 |
| a. Viabilidad..... | 24 |
| b. Potencial de membrana mitocondrial..... | 25 |
| c. Integridad acrosomal..... | 26 |
| 2.5.2.1. Citometría de flujo..... | 26 |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 28 |

| | |
|--|----|
| 3.1 Criterios de selección para la toma de muestra del semen.. | 28 |
| 3.2 Método de colección del semen de perro sin pelo del Perú. | 28 |
| 3.3 Evaluación básica..... | 28 |
| 3.4 Evaluación de la funcionalidad..... | 29 |
| 3.5 Análisis estadístico..... | 31 |
| IV. RESULTADOS..... | 32 |
| V. DISCUSIÓN..... | 39 |
| VI. CONCLUSIONES..... | 44 |
| VII. RECOMENDACIONES..... | 45 |
| VIII. BIBLIOGRAFÍA..... | 46 |
| IX. ANEXOS..... | 51 |

ÍNDICE DE CUADROS:

| | Pag. |
|---|------|
| Cuadro N°1: Estándar del perro sin pelo del Perú..... | 16 |
| Cuadro N°2: Valores promedios de los parámetros evaluados básicos y de funcionalidad del semen del perro sin pelo del Perú..... | 33 |
| Cuadro N°3. Valores promedios de los parámetros de funcionalidad del semen del perro sin pelo del Perú..... | 33 |
| Cuadro N°4 Distribución del porcentaje de la concentración espermática, motilidad espermática, viabilidad espermática, potencial de membrana mitocondrial e integridad acrosomal..... | 34 |

ÍNDICE DE FIGURAS:

| | Pag. |
|--|------|
| Figura N°1: Grafica de puntos representativo de la evaluación de la viabilidad espermática del semen del perro sin pelo del Perú utilizando SYBR-14/PI..... | 34 |
| Figura N°2: Imagen de la evaluación de la viabilidad espermática del semen del perro sin pelo del Perú utilizando SYBR-14/PI..... | 35 |
| Figura N°3: Histograma representativo de la evaluación del potencial de membrana mitocondrial espermática del semen del perro sin pelo del Perú utilizando Mito Tracker Deep Red FM..... | 35 |
| Figura N°4: Imagen de la evaluación del potencial de membrana mitocondrial espermática del semen del perro sin pelo del Perú utilizando Mito tracker Deep Red FM..... | 36 |
| Figura N°5: Grafica de puntos representativo de la evaluación de la integridad acrosomal espermática del semen del perro sin pelo del Perú utilizando FITC-PSA/PI..... | 37 |
| Figura N°6: Imagen de la evaluación de la integridad acrosomal espermática del semen del perro sin pelo del Perú utilizando FICT-PSA/PI..... | 38 |

ÍNDICE DE ANEXOS:

| | Pag. |
|---|------|
| Anexo N°2. Cuadro con todos los resultados del espermatoograma básico y de funcionalidad..... | 51 |
| Anexo 1. Imágenes obtenidas de la evaluación de la viabilidad espermática, potencial de membrana mitocondrial e integridad acrosomal de todas las muestras del semen del perro sin pelo del Perú..... | 51 |

RESUMEN

El perro sin pelo del Perú es una raza reconocida como patrimonio cultural de la nación. Para poder preservar y conocer esta raza es importante conocer las características seminales normales. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue caracterizar el semen del perro sin pelo del Perú en un grupo de machos clínicamente normales. Quince machos de raza Perro sin pelo del Perú de edades entre 1 a 5 años, inscritos en el Kennel Club Peruano fueron utilizados para coleccionar semen ($n = 15$) mediante manipulación digital. Inicialmente se realizó un espermograma básico y se registró el volumen, color, la motilidad y concentración espermática. Posteriormente se evaluó la funcionalidad y se utilizaron 3 alícuotas de 100 μL de cada muestra para evaluar (1) viabilidad espermática (SYBR-14 y Ioduro de Propidio), (2) Potencial de membrana mitocondrial (PMM) (MitoTraker Deep Red FM), y (3) integridad acrosomal (FITC-PSA/PI). Cada alícuota fue incubada a 38°C por 10 minutos en oscuridad. Las lecturas fueron realizadas utilizando un citómetro de flujo con sistema analizador de imágenes, adquiriendo 10 mil eventos compatibles con espermatozoides. Se consideraron espermatozoides vivos a aquellos que presentaron fluorescencia verde (SYBR14), espermatozoides muertos a aquellos que presentaron fluorescencia roja (PI), espermatozoides con alto PMM a aquellos que presentaron fluorescencia naranja (Mito Tracker) en la pieza media y espermatozoides con daño acrosomal a aquellos que presentaron fluorescencia verde (FITC-PSA) en la región acrosomal. El valor promedio para el volumen fue de 6.13 mL \pm 5.01, el color fue blanquecino, la motilidad tuvo un valor promedio de 66.67 \pm 18.87 %, la concentración espermática tuvo un valor promedio de 262.7 $\times 10^6 \pm 36.78 \times 10^6$ espermatozoides/mL. Los valores obtenidos mediante citometría de flujo fueron 77.74% \pm 17.62% de viabilidad espermática; 85.95% \pm 12.91% de PMM y 73.95% \pm 25.13% viabilidad/integridad acrosomal. Estos resultados representan el primer reporte sobre las características seminales de esta raza y podrían constituir una base para futuras investigaciones, como también valores de referencia para una mejor selección de machos reproductores orientados a la preservación del perro sin pelo del Perú.

Palabras clave: Perro sin pelo del Perú, semen, citometría de flujo.

ABSTRACT

The hairless dog of Peru is a race recognized as the nation's cultural heritage. In order to preserve and know this breed it is important to know the normal seminal characteristics. Therefore, the objective of this study was to characterize the semen of the Peruvian hairless dog in a group of clinically normal males. Fifteen breed males of Peruvian hairless dog aged between 1 and 5 years, enrolled in the Peruvian Kennel Club were used to collect semen ($n = 15$) by digital manipulation. Initially, a basic spermatogram was performed and volume, color, motility and sperm concentration were recorded. Subsequently, the functionality was evaluated and 3 aliquots of 100 μL of each sample were used to evaluate (1) sperm viability (SYBR-14 and Propidium Iodide), (2) Mitochondrial membrane potential (MMP) (MitoTracker Deep Red FM), and (3) acrosomal integrity (FITC-PSA / PI). Each aliquot was incubated at 38 ° C for 10 minutes in the dark. The readings were made using a flow cytometer with an image analyzer system, acquiring 10,000 events compatible with sperm. Live spermatozoa were those that showed green fluorescence (SYBR14), killed spermatozoa to those that showed red fluorescence (PI), spermatozoa with high PMM to those that showed orange fluorescence (Mito Tracker) in the middle piece and sperm with acrosomal damage to those that presented green fluorescence (FITC-PSA) in the acrosomal region. The average value for the volume was 6.13 mL \pm 5.01, the color was white, the motility had an average value of 66.67 \pm 18.87%, and the sperm concentration had an average value of 262.7 $\times 10^6 \pm 36.78 \times 10^6$ sperm / mL. The values obtained by flow cytometry were 77.74% \pm 17.62% sperm viability; 85.95% \pm 12.91% of PMM and 73.95% \pm 25.13% viability / acrosomal integrity. These results represent the first report on the semen characteristics of this breed and could constitute a basis for future research, as well as reference values for a better selection of breeding males oriented to the preservation of the Peruvian hairless dog.

Key words: Peruvian hairless dog, semen, flow cytometry.

I. INTRODUCCIÓN

La raza canina “Perro sin Pelo del Perú” fue reconocida como patrimonio nacional por ser una raza oriunda del Perú, reconocida por la Federación Cinológica Internacional (FCI) el 12 de junio de 1985 como nueva raza. A esta raza se le atribuye ciertas propiedades curativas. Se dice que, en el antiguo Perú, existen representaciones de estos perros en cerámicas, pinturas rupestres y cuadros en diferentes culturas. Se cree que estos perros eran acompañantes en rituales y también eran perros que acompañaban a sus dueños en trabajos de casería. En el periodo incaico, estos perros eran guardados en los palacios y solo se soltaban de noche para que no se junten con otros perros, ya que estos perros pertenecían a la realeza. Existía una buena selección de esta raza y solo se podían reproducir entre ellos (Osorio y Gálvez, 2015; FCI, 2013).

Los ejemplares de esta raza canina, en especial los de tamaño grande, tienen un gran número de camadas que superan las 6 crías por parto, y esto podría ser por el factor macho o hembra. En la actualidad no se tienen parámetros ni datos, tanto en el macho como en la hembra en el aspecto de la reproducción, pero existe la tendencia equivocada de responsabilizar a la hembra cada vez que tenemos malos índices reproductivos o no esperados, no obstante, el macho tiene un rol importante en la fertilidad de los canidos y más aún cuando un macho debe cubrir varias hembras (Tello et al., 1988).

En la actualidad muchos criadores realizan una evaluación de fertilidad de sus machos reproductores, para lo cual se necesita evaluar los parámetros seminales: tanto macroscópica y microscópicamente (Tello et al., 1988); como son el color, que debe ser blanco lechoso de aspecto cremoso. Este color dependerá de la concentración espermática (Angulo, 2011) y de la raza, como en el Pastor Alemán tiene un color blanco brillante (Tello et al, 1988) y con aspecto acuoso. Este color también puede variar por la presencia de sangre o por el hecho que esté contaminado (Lissette, 2012). El semen tiene un olor característico que se denomina “*Sui generis*” (Angulo, 2011).

El volumen del semen se expresa en mL y está influenciado por la raza, por ejemplo, en el Pastor Alemán, considerado de raza grande, tiene un promedio de 22,90 mL (Tello et al, 1988) y en razas pequeñas el valor es menor.

Otros factores que influyen en el volumen son: edad, excitación del animal, peso del animal; teniendo como promedio de volumen seminal para la especie de 1 a 30 mL, el pH promedio es de 6,3 a 6,7 (Fernández et al, 2015). En el aspecto microscópico, la concentración de los espermatozoides se ve influenciado por la raza. Por ejemplo, en la raza Pastor Alemán tenemos una concentración de $439,6 \times 10^6/\text{mL}$, Pastor de Mallinois $456,3 \times 10^6/\text{mL}$ (Reatiaga, 2015) y Syberian Husky $338 \times 10^6/\text{mL}$ (Sánchez y Rulbibar, 2001). Estos valores nos indican claramente la diferencia de concentración espermática por razas, se toma para todas las razas como promedio de concentración espermática 300 a 2000 $\times 10^6/\text{mL}$ de espermatozoides (Angulo, 2011). La motilidad espermática también se ve influenciado por la raza. La cual se mide en porcentajes (%). Por ejemplo, en las razas Bóxer y Labrador, tenemos una motilidad progresiva de 83,8%, en Pastor Belga Mallinois 83,3%, en el Pastor Alemán 78,4% y en otras razas un 80% (Reatiaga, 2015; Lisette, 2012).

Otro parámetro medible es la morfología de los espermatozoides. Se puede dar alteraciones en los testículos o en el epidídimo y el manejo, pero también se demostró que existe una diferencia entre razas. Se mide en porcentaje, teniendo valores como: en el Pastor Alemán con 78%, en el Dálmata 88%, en el Labrador 80%, en el San Bernardo con 75%. Se recomienda que no baje de 70% de espermatozoides morfológicamente sanos en los perros (Angulo, 2011).

Las evidencias de la variación de características seminales en otras razas caninas hacen pensar que el semen del Perro sin Pelo del Perú, también podía presentar características particulares aún no descritas. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue caracterizar los aspectos básicos y funcionales del semen de la raza del Perro sin Pelo del Perú.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

2.1 Historia del Perro sin Pelo del Perú

El perro sin pelo del Perú también conocido en el norte del Perú como viringos, ccala o calatos, sechura o chimo por la cultura Chimú (Weiss, 1970), en la ciudad del Cusco se le conoce como perro orquídeo debido a que el color se le asemeja a algunas variedades de orquídeas (Maniero, 2015).

Existen varias hipótesis sobre la llegada o la aparición de estos perros en el Perú. Existen diferentes hipótesis como el del Xoloitzcuintle o mejor conocido como el perro calato mexicano. Todos los datos disponibles, indican que su origen fue en el occidente de México y posteriormente se dispersó a la región Maya y al centro de México (Valadez y Mestre, 2007). Se cree que los antiguos Aztecas llevaron al Xoloitzcuintle del territorio mexicano al andino hace unos 3300 años aproximadamente (Vásquez *et al.*, 2016), donde hubo contacto cultural entre Mesoamérica y Sudamérica, lo que se confirma con las pruebas esculturales, porque se encontraron vasijas similares en La Libertad, Perú, Anahuác, México y Quito, Ecuador (Vásquez *et al.*, 2016). Otro registro arqueobotánico que nos hace pensar que hubo contacto entre culturas, son los restos macrobotánicos de maíz (Bird, 1990).

Por lo tanto, se cree que la primera colonia fundadora del perro mexicano habría llegado aproximadamente hace 3300 años a territorio peruano (Vásquez *et al.*, 2016). Esta raza habría tenido acogida por sus peculiaridades morfológicas y el culto que se les brindaba. Se cree que una colonia fundadora de Xoloitcunintle fue el origen del perro sin pelo del Perú y, a partir de esta colonia, se forma una nueva raza primitiva.

El aislamiento geográfico que tuvo esta raza facilita la deriva genética y se produjeron mutaciones genéticas, que provocaron cambios en el fenotipo del perro (Maniero, 2015). En el periodo incaico, se cree que eran muy comunes los de color negro y gris, sin embargo, cuando nacía uno de color cobre o dorado, era presagio de buena suerte para la comunidad y los sacrificaban en ofrenda a sus dioses y solo los de la nobleza podían tener perros calatos (Osorio y Gálvez, 2015), hasta que en cierta ocasión un gobernador prohibió el sacrificio de estos

ejemplares porque eran de color del Dios sol y de esta forma se salvó de ser extinto esta variedad del perro sin pelo del Perú (Maniero, 2015).

El perro sin pelo del Perú vivía en palacios, templos y lugares sagrados donde eran venerados. En la actualidad, se pueden encontrar cerámicas que representan al perro sin pelo del Perú en el Museo Nacional de Arqueología, Antropología e Historia del Perú, con ello se puede comprobar que el perro sin pelo del Perú estaba en todo el territorio del Tahuantisuyo. También se encontraron cerámicas representando al perro sin pelo del Perú en diferentes culturas pre incas, como las culturas Moche, Vicus, Chancay y Chimu (Vásquez *et al.*, 2016). Una vez que ocurrió la conquista por los españoles, esta raza empezó a ser sacrificada, porque pensaban que servía para realizar brujería y actos diabólicos, incluso casi llegando a la extinción de esta raza canina. Hubo un pequeño grupo de pobladores que rescataron a algunos perros sin pelo del Perú y vivieron algunos siglos más. En el siglo XX, estos ejemplares fueron criados por hacendados de La Libertad y Piura, mas no faltaron personas que preservaron la raza hasta nuestros días. En la actualidad se pueden observar ejemplares en las calles del norte del Perú como por ejemplo Piura (Maniero, 2015; Vásquez *et al.*, 2016). También en la actualidad existen criaderos que se dedican exclusivamente a la crianza de esta raza y su preservación respetando los parámetros del estándar (Maniero, 2015).

a. Estándar del Perro Sin Pelo Del Perú

El encargado de realizar el estándar de esta raza fue el Cinólogo Ermano Maniero, siendo aprobado por la FCI el 12 de junio de 1985, como de origen peruano, con el nombre de Perro sin Pelo del Perú, el cual, hasta la fecha, tuvo 5 actualizaciones (Maniero, 2015).

El perro sin pelo del Perú es utilizado como perro de compañía. Pertenecen al grupo 5 perros tipo Spitz y tipo primitivo, sin prueba de trabajo (FCI, 2013) y el estándar de la raza es como se menciona en el Cuadro N°1.

Cuadro N°1. Estándar del Perro Sin Pelo del Perú.

| Características | Descripción |
|-----------------------------------|---|
| Apariencia general | Es un perro esbelto, elegante cuyo aspecto expresa velocidad, fuerza y armonía. |
| Proporciones importantes | Relación altura – cruz es de 1:1, en hembras el cuerpo es ligeramente más largo que los machos. |
| Temperamento | Es noble y afectuoso, pero desconfiado con los extraños. |
| Cabeza | De conformación lupoides. Cráneo: Mesocéfalo ortoide, es ancho afilándose a la punta de la nariz, stop poco marcado. Región facial: trufa bien pigmentada, la mordida debe ser en tijera. En la variedad sin pelo, se acepta la falta de algunas piezas dentarias, las orejas deberían ser erectas en atención y, en reposo, ligeramente tiradas hacia atrás. |
| Cuello y piel | El cuello debería ser ancho, arqueado y aproximadamente del mismo largo que la cabeza. La piel debe ser pegada, fina, elástica. El color en la variedad desnuda se acepta en negro, negro ceniza, cobre, bronce, marrón oscuro, negro con manchas excepto albinos. |
| Miembros anteriores y posteriores | Miembros anteriores: deberían ser aplomados, los codos no deben sobresalir, los pies son ligeramente largos con membranas interdigitales bien desarrolladas y color de uñas negros de preferencia. Miembros posteriores: músculos elásticos y redondos notorios en las nalgas, visto de atrás debe de ser bien aplomado. |
| Tamaño y peso | Pequeño: deberían ser de tamaño de 25-40 cms a la cruz y de peso entre 4-8 Kg. Mediano: deberían ser de tamaño de 41-51 cms. a la cruz y de peso entre 8-12 Kg. |

| | |
|--|---|
| | Grande: deberían ser de tamaño de 51-65 cms a la cruz y de peso entre 12-30 Kg. |
|--|---|

b. Importancia del Perro sin Pelo del Perú.

El perro sin pelo del Perú es una raza originaria de nuestro país, fue reconocida como patrimonio de la nación. Esta raza está siendo modificada genéticamente por la irresponsable crianza de algunos criadores, modificando así más de dos mil años de pureza genética. Esta raza y la mitología que lo rodea es parte del origen de muchas civilizaciones del Perú (Maniero, 2015).

El 22 de octubre del 2001, el Congreso de la República declaró al perro sin pelo del Perú como Patrimonio Nacional mediante la ley N°27537. Tres años después se creó un comité nacional que se encarga de la protección del perro sin pelo del Perú conformado por entidades públicas y privadas. El 12 de junio del 2006, se declaró que, esa fecha, sería el día del perro sin pelo del Perú (Osorio y Gálvez, 2015).

El perro sin pelo del Perú debe ser conservado como era en la antigüedad o como los perros originarios, porque son piezas fundamentales para el entendimiento de nuestra historia. Una de las características más resaltantes, es la temperatura de esta raza, que está entre 38.5° C – 42°C. Al tener la piel desnuda da la sensación de mayor temperatura. El perro sin pelo del Perú se usaba como calentador natural por su temperatura elevada y se cree que alivia dolores como reumatismo y artritis. En la actualidad los médicos humanos recomiendan criar esta raza a las personas alérgicas al pelo, personas con problemas bronquiales y asma, pues al no tener pelo no causa problemas respiratorios (Osorio y Gálvez, 2015; Maniero, 2015). Sin embargo, se realizó un estudio en el perro sin pelo del Perú y se demostró que tiene una temperatura de 38.53°C, que se encuentra dentro del rango de la temperatura para la especie que va desde 37.5°C – 39.5°C, dicho promedio encontrado de la temperatura es lo normal o ideal para la especie (Fiestas, 2014).

2.2 Anatomía del aparato reproductor canino macho.

El aparato reproductor del canino está compuesto por los siguientes órganos:

- Uretra: Se divide en dos: uretra pelviana y uretra esponjosa. Su función es transportar orina y espermatozoides de forma separada (Sorribas, 2005).
- Pene: Es el órgano copulador del macho (Stornelli y De la Sota, 2008). Es un órgano con doble funcionalidad: dejar el semen dentro de la hembra y expulsar la orina (Galiana y Valencia, 2008). El canino presenta el hueso peneano o también llamado os *penis* (Sorribas, 2005)
- Prepucio: Es una vaina de piel que se encarga de envolver al pene en su porción distal. Tiene como única funcionalidad la protección del pene (Paramo y Balcazar, 2005; Stornelli y De la Sota, 2008).
- Testículo: Los testículos son en número de dos y tienen como función principal la producción de espermatozoides y testosterona (Galiana y Valencia, 2008). El origen de los espermatozoides se da en los túbulos seminíferos que se encuentran dentro de la estructura testicular (Sorribas, 2008).
- Epidídimo: Se encuentra ubicada en la parte dorso lateral del testículo y se divide en 3 porciones: cabeza, cuerpo y cola (Stornelli y De la Sota, 2008). Su función principal es de proveer un ambiente adecuado para la maduración del espermatozoide, también sirve como reservorio de espermatozoides (Sorribas, 2008).
- Conducto deferente: Ascende como un componente del cordón espermático. Su única función es el transporte de espermatozoides (Sorribas, 2008).
- Próstata: Es la única glándula accesoria en el canino (Stornelli y De la Sota, 2008). El tamaño de este órgano varía de acuerdo a la raza y se encuentra ubicada alrededor del cuello de la vejiga e inicio de la uretra; y se divide en lóbulo izquierdo y derecho. Tiene como función principal la producción de plasma seminal (Sorribas, 2005) que contribuye al 100% en la formación del semen, ya que esta es la única glándula accesoria que poseen los perros (Galiana y Valencia, 2008).

2.3 Fisiología de la reproducción del macho:

El sistema reproductor del macho está constituido por los órganos sexuales primarios que están conformados por los testículos o gónadas. Luego tenemos

los órganos sexuales secundarios, que son un sistema canicular constituido por la red de testis, conducto eferente, epidídimo, conductos deferentes y glándulas accesorias, cuya función es crear el plasma seminal.

Los testículos son órganos pares de forma ovalada, se ubican en la región inguinal y son alojados por las bolsas escrotales que sirven de protección, así como para una correcta función espermatogénica. En el perro el escroto está ubicado en un punto medio entre el ano y la región inguinal, siendo las gónadas pequeñas y ovoides (Davol, 2001).

Los testículos son los principales órganos del aparato reproductor masculino, estos órganos sexuales primarios tienen dos funciones fisiológicas principales e importantes, que son: la función exocrina o espermatogénica y la endocrina o producción de andrógenos. Sin embargo, todas las funciones testiculares se ven influenciadas por el sistema neuroendocrino (Cunningham y Klein, 2009).

2.3.1 Espermatogénesis

A partir de las células germinativas masculinas que se ubican en los túbulos seminíferos de los testículos se forman los espermatozoides (Allen, 1992; Davol, 2001; Cunningham y Klein, 2009). Existen células llamadas espermatogonias, que posteriormente se convierten en espermatozoides. Las espermatogonias se dividen por mitosis para llegar a ser espermatoцитos, posteriormente los espermatoцитos se dividen por meiosis para llegar a ser espermátidas. Las espermátidas se convierten en espermatozoides por un reagrupamiento de organelos, teniendo así que, el núcleo se convierte en la cabeza del espermatozoide, las mitocondrias y centriolos forman la cola y el aparato de Golgi forma el acrosoma (Allen, 1992; Cunningham y Klein, 2009). El ciclo de los espermatozoides tarda un aproximado de 8 semanas en completarse (Allen, 1992).

La espermatogénesis comienza cuando aún son cachorros, aproximadamente a los 4 meses de edad, pero no se observan espermatozoides hasta los 10-12 meses de edad en el eyaculado (Allen, 1992).

La calidad del semen eyaculado es afectada por diferentes factores como: edad, frecuencia de eyaculación, excitación del animal y cómo la muestra es manipulada durante la recolección y evaluación (Davol, 2001).

2.3.2 Transporte del semen:

Las dos últimas semanas los espermatozoides terminan su maduración en el epidídimo, llegan inmaduros a la cabeza de éste, y terminan su maduración durante todo el paso por el epidídimo. Al entrar al conducto deferente, pierden la gota citoplasmática residual y esta es expulsada del espermatozoide o se va hacia el extremo distal y, es allí, cuando se le considera maduro. Un extremo del epidídimo se adelgaza y pasa a ser el conducto deferente, para que el espermatozoide pueda salir del escroto (Allen, 1992; Davol, 2001).

2.3.3 Eyaculación

Durante la eyaculación los espermatozoides pasarán del epidídimo al conducto deferente. Posteriormente, a la uretra donde se combinará con el líquido seminal secretado por la próstata, para luego ser expulsado en la eyaculación (Davol, 2001).

2.4 Métodos de recolección de semen

La recolección de semen se puede realizar con o sin la presencia de una hembra, esto se puede realizar mediante manipulación digital, electro-eyaculación (Restrepo *et al*, 2009) o usando una vagina artificial (Roman *et al*, 2014).

2.4.1 Manipulación digital

En la técnica de la manipulación digital, se requiere que la persona esté ubicada en el lado izquierdo del animal en caso de perros y estimule el pene con la mano con movimientos de adelante hacia atrás. Una vez que protruya el pene, los dedos deben ubicarse detrás del bulbo peneano ejerciendo una ligera presión simulando las contracciones vaginales de la hembra y posteriormente recolectar el eyaculado en el recipiente que se va a usar. (Restrepo *et al*, 2009).

2.4.2 Electro-Eyaculación

Esta técnica se usa básicamente con fines de investigación o para realizar trabajos con animales de zoológico, ya que es una técnica traumática y se

necesita anestesiar al animal y la calidad de la eyaculación es muy baja: esta varía entre 0.5 mL y 0.8 mL (Altamirano y Pereira, 2011).

Para esta técnica se requiere un electro-eyaculador que tiene un electrodo, y una batería que produce descargas de no más de 20 voltios. Esto sirve como estimulador a nivel de los nervios pélvicos simpáticos y parasimpáticos. La técnica consiste en colocar en un polo del electro eyaculador una pieza metálica con el grosor de un lápiz y que tenga 10 cm de longitud. Luego dar pequeños pulsos eléctricos muy leves en la próstata y, la otra pinza, se fija en los sacos anales y se aplican estímulos eléctricos de 1-3 segundos con descansos de 7-9 segundos, pero como ya se mencionó, la cantidad y la calidad del semen es muy baja (Roman *et al*, 2014; Altamirano y Pereira, 2011).

2.4.3 Vagina Artificial

Mediante esta técnica los animales desarrollan la cadena de reflejos y la mecánica del coito, aunque no exista copulación propiamente dicha con la hembra. Una de las desventajas para poner en práctica este método es que se requiere de animales entrenados y dóciles. Pero la recolección del semen mediante vagina artificial nos permite ver la conducta sexual y tener eyaculados más limpios y a menor costo. La técnica consiste en un tubo largo de plástico o goma que se dobla por los extremos y este se llena de agua caliente y aire, con el fin de proveer un ambiente similar al de la vagina de la perra de esta forma se logra la eyaculación del macho (Roman *et al*, 2014).

2.5 Semen del perro

El semen es el contenido espermático más el plasma o líquido seminal (Stornelli y De la Sota, 2008). El perro tiene una sola glándula accesoria que es la próstata la cual aporta el 100 % del plasma seminal (Galiana y Valencia, 2008).

El semen canino presenta diferencias significativas en volumen y concentración espermática. Esta diferencia se da por el tamaño y raza de los perros (Feldman y Nelson, 1996; Stornelli y De la Sota, 2008; Carlotto, 2009).

2.5.1 Características y parámetros de evaluación básicas

a. Volumen

El rango del eyaculado es de 1 – 15 mL, y se ha visto casos de hasta 30 mL (Angulo, 2011). Esto va depender mucho del tamaño del perro y la raza (Feldman y Nelson, 1996; Stornelli y De la Sota, 2008; Carlotto, 2009). Por ejemplo, tenemos al Pastor Alemán, con un promedio de 22.90 mL \pm 14.47 (Tello *et al.*, 1988), mientras que en los Yorkshire Terrier, va desde 2-3 mL de volumen seminal (Páramo y Balcázar, 2005).

El eyaculado de los perros se puede dividir en 3 fracciones: la fracción pre espermática, que tiene un volumen de 0.2 – 2 mL; la fracción espermática, que tiene un volumen 0 – 4 mL y la fracción prostática, que tiene un rango de 3 – 30 mL. Estos valores van a depender mucho del tamaño y la raza del perro. (Feldman y Nelson, 1996; Stornelli y De la Sota, 2008; Carlotto, 2009; Angulo, 2011).

b. Color

Este parámetro debe ser evaluado por observación directa. El color puede ser un blanco nacarado, blanquecino, blanco oscuro o opalescente. La intensidad del color blanco nos refleja la concentración de espermatozoides. Cualquier cambio de color puede ser indicio de algún problema en el sistema reproductor. Pueden existir cambios de color como: amarillo esto nos indicaría la presencia de orina; el color rojo nos indicaría presencia de sangre y el color verde, nos indicaría presencia de pus (Stornelli y De la Sota, 2008; Carlotto, 2009; Angulo, 2011).

c. Olor

El olor es algo característico y propio del semen canino, este olor procede de las glándulas perianales, glándulas prepuciales y sacos anales. En este caso lo que no se busca es que el semen tenga un olor pútrido o amoníaco. Es por eso que, al olor del semen, se le denomina “*Sui generis*” (Angulo, 2011; Altamirano y Pereira, 2011).

d. pH

El pH del semen canino es de 6.5 – 7 (Feldman y Nelson, 1996; Páramo y Balcázar, 2005), sin embargo (Carlotto, 2009) menciona que cada fracción espermática tiene diferente pH, fracción pre espermática 6.2-6.5, fracción

espermática 6.3-6.6 y la fracción post espermática 6.5-7 de pH. Ahora bien, el pH también depende de la cantidad del eyaculado y si el aparato reproductor está sano (Altamirano y Pereira, 2011).

e. Motilidad

En el semen canino la motilidad debe ser mayor o igual al 70 %, con movimiento de los espermatozoides. Ese porcentaje, se podría decir, es una muestra normal (Stornelli y De la Sota, 2008; Carlotto, 2009). Este parámetro es un indicativo que tienen los espermatozoides para llegar al óvulo y fertilizarlo (Altamirano y Pereira, 2011). En el perro no se observan olas como en el semen de los bovinos y ovinos (Páramo y Balcázar, 2005).

La forma correcta de evaluar este parámetro es a una temperatura de 37.5°C, ya que la motilidad se ve completamente afectada, según el cambio de temperatura brusca y con la luz del microscopio (Altamirano y Pereira, 2011).

En algunas razas caninas, como por ejemplo: en los Pastores Alemanes, se encontró una motilidad de 65% ± 29.91% (Tello *et al.*, 1988). En el Golden Retriever, Labrador, una motilidad de 89% ± 2.5%, Pastor Belga de Mallinois un 83,3% y el Cimarron Uruguayo, con un promedio de 64.2% ± 4.9% (Reatiga, 2015; Amaya, 2012; Salinas et al, 2013, Fernández, 2016).

f. Morfología

La morfología es un parámetro indispensable para la evaluación espermática. Este parámetro está estrechamente relacionado con la fertilidad canina y con la motilidad, como en otras especies (Stornelli y De la Sota, 2008;).

Los machos caninos reproductores no deben tener menos del 70% de espermatozoides anormales, mientras que el 30% sobrante, se puede dividir que el 10% no debe tener malformaciones primarias, tales como: malformaciones en cabeza, cola, colas dobles, gota citoplasmática; y el otro 20% pueden ser malformaciones secundarias, que podrían ocurrir durante el manejo, o en el transporte del semen desde el testículo hasta ser eyaculado. Sin embargo, Altamirano y Pereira, (2011) dice que un perro normal debe tener un 80% de espermatozoides normales y un máximo de 20% de espermatozoides anormales.

g. Concentración espermática

La concentración espermática es un parámetro muy importante al momento de evaluar el semen en cualquier especie. La concentración espermática es un aproximado del número de espermatozoides por mL. Este conteo se realiza en una cámara de Neubauer con la ayuda de un microscopio (Angulo, 2011).

La concentración puede variar por diferentes factores como son: edad, raza, estado de salud, nivel de excitación del perro, tamaño testicular, actividad sexual y frecuencia del recogido. Un eyaculado normal debe tener entre 200 –1,000 millones de espermatozoides por mililitro. Se requiere mínimo de 100 millones de espermatozoides para preñar a una perra (Altamirano y Pereira, 2011).

Es así que en diferentes estudios realizados, se encontró que existe una diferencia entre las diversas razas de perros, teniendo a los Pastores alemanes con una concentración de $439.6 \times 10^6 / \text{mL} \pm 237.3$, Pastor Belga Mallinoise $456.3 \times 10^6 / \text{mL} \pm 237.3$ (Reatiaga, 2015), siendo estos perros de raza grande.

2.5.2 Características y evaluación de la funcionalidad.

En la actualidad existen diversos métodos para evaluar los parámetros de funcionalidad o capacidad fecundante, entre los parámetros de evaluación más importantes tenemos:

a. Viabilidad espermática

La técnica para evaluar la funcionalidad de los espermatozoides debe ser confiable y automatizada. Para evaluar si la membrana plasmática del espermatozoide esta integra o dañada, se basa en la permeabilidad de ciertos fluorocromos (Shurmann *et al*, 2002). Para evaluar la viabilidad se usa el Ioduro de Propidio (PI) que marcan los muertos, este fluorocromo es impermeable y actúa cuando la membrana está dañada y se une al ADN. Este se conjuga con tintaciones permeables como SYBR-14 y, este actúa como marcador de los espermatozoides vivos que tienen la membrana plasmática intacta (Brito *et al*, 2003).

La viabilidad es considerada como el porcentaje de espermatozoides vivos con la membrana plasmática íntegra (Rijsselaere *et al*, 2002). Estos pueden ser evaluados mediante citometría de flujo y ser clasificados vivos o muertos. Se

realizaron algunos estudios en semen canino en donde se encontraron los siguientes valores $66.8\% \pm 6.8\%$ de espermatozoides viables en los perros de raza Labrador y Golden Retriever (Treulen *et al*, 2012), en Chihuahua $57.80\% \pm 15.19\%$ de espermatozoides viables (Salinas *et al*, 2014).

b. Potencial de Membrana mitocondrial

Este parámetro está estrechamente relacionado con la fertilidad, estado energético y la movilidad del espermatozoide. Este es un indicador sensible del estado energético de los espermatozoides (Salinas, 2013). Al igual que en otras células, existen dos formas por donde los espermatozoides producen su propia energía y son: por fosforilación oxidativa mitocondrial y por la glucólisis. Sin embargo, las mitocondrias son la fuente principal de producción de energía para la movilización de los espermatozoides (Allauca, 2017).

Existen aproximadamente 100 mitocondrias en la pieza media de los espermatozoides y se pueden utilizar fluorocromos para determinar el potencial de membrana mitocondrial, como el Mitotracker Deep Red – FM. Este actúa penetrando a la célula y acumulándose en las mitocondrias (Sánchez, 2014). Se hicieron algunos estudios en semen canino, obteniendo $84.5\% \pm 7.1\%$ de potencial de membrana mitocondrial de los espermatozoides, en las razas Golden Retriever y Labrador Retriever (Treulen *et al*, 2012).

c. Integridad acrosomal

La determinación de la integridad del acrosoma antes de la reacción acrosomal, se ha convertido en parámetro muy útil para la evaluación de infertilidad en reproductores machos (Ugarelli, 2016). El acrosoma tiene un papel muy importante en la fecundación, ya que solo los espermatozoides con acrosoma intacto pueden realizar dicha acción que es la reacción acrosomal y de forma sincronizada con la fase de la penetración del oocito, de esta forma, pasar la zona pelúcida y fusionarse con este, para la formación del embrión. Cuando se realizan trabajos de congelamiento de semen, el acrosoma suele alterarse y tener fertilidad baja (Cabrera y Pantoja, 2012).

La técnica más usada para determinar la integridad acrosomal es por fluorescencia, el método más usado es por las lectinas, que son de origen

vegetal y estas, tienen la capacidad de unirse a carbohidratos que se encuentran en el acrosoma, existen diferentes lectinas para la evaluación de la integridad acrosomal, como el *Pisum sativum* (PSA), que puede ser conjugada con *Arachis hypogaea* (FITC) (Andrade, 2005). En un estudio realizado en perros de raza Golden Retriever y Labrador Retriever, se encontró que tienen $35.2\% \pm 3.9\%$ de espermatozoides con el acrosoma dañado (Pérez *et al*, 2012).

2.3.2.1. Citometría de flujo

En las dos últimas décadas, la citometría de flujo se ha convertido en gran ayuda para el estudio de poblaciones espermáticas. Para lo cual, se han desarrollado distintos métodos de tinción y combinaciones de fluorocromos y, como resultado de todos estos avances hoy en día esta técnica nos ofrece la posibilidad de realizar múltiples análisis de características espermáticas al mismo tiempo en la misma muestra, de forma rápida, precisa y objetiva.

Entre las características espermáticas analizadas más frecuentemente tenemos: viabilidad espermática, integridad acrosomal y funcionalidad de las mitocondrias. También nos permite obtener una muestra de espermatozoides sexados, ya sea para inseminación artificial o fecundación in-vitro (Muiño, 2008).

La citometría de flujo tiene distintas áreas en donde puede ser aplicado como: microbiología, hematología, citología, patología, biología; entre otros (Córdova *et al*, 2016). Una de las principales ventajas que tiene la citometría de flujo, en comparación con otros métodos de análisis, es que tiene la capacidad para medir varios parámetros de miles de células individuales en pocos minutos (Matas, 1997).

La citometría de flujo es un método rápido, cuantitativo y objetivo del análisis de las células y, como su propio nombre lo indica, es la medida de las células en un sistema de flujo (Matas, 1997; Córdova *et al*, 2016).

El principio básicamente es hacer pasar células u otras partículas en forma alineada, una por una, por un haz luminoso, esta medición es a alta velocidad (100 - 1,000 partículas por segundo). Esta información producida, puede ser agrupada en dos tipos fundamentales: por la dispersión de la luz y la emisión de la luz por los fluorocromos en la célula o partículas que fueron excitados por el

rayo luminoso. Luego, las señales luminosas detectadas son transformadas en impulsos eléctricos, que se amplifican y son convertidas en señales digitales que, posteriormente, son procesados por una computadora. Una vez obtenida la información de las poblaciones y subpoblaciones, estos son analizados por programas especializados que le sean útiles al investigador (Matas, 1997; Córdova et al, 2016).

“Las principales características analíticas de un citómetro de flujo son que pueden medir diferentes parámetros celulares, como: forma, tamaño, estructura y complejidad de propiedades celulares, de partículas tan pequeñas como 0.1 μm , y también, cualquier componente celular que pueda ser marcado con algún fluorocromo” (Córdova et al, 2016).

La citometría de flujo nos indica 3 cosas básicas en una muestra de experimento: el tamaño de la célula o partícula, la complejidad relativa interna y la intensidad de la fluorescencia de una forma relativa (Laguado, 2007).

La citometría de flujo en el área de la reproducción animal en la actualidad, es un método confiable y económico para analizar distintas características espermáticas, como son: viabilidad espermática, integridad acrosomal y funcionalidad mitocondrial o potencial de membrana mitocondrial (Córdova *et al*, 2016).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Criterios de selección para tomar muestra de semen.

Se utilizaron perros machos de la raza Sin Pelo del Perú registrados en el Kennel Club Peruano (KCP), eran machos no menores de 1 año de edad, que previamente se les realizó un examen clínico para ver si los ejemplares estaban sanos.

Se descartó perros mayores de 5 años, que estén cursando alguna patología y que no estén registrados en el KCP.

3.2 Método de colección de semen del perro sin pelo del Perú.

Se recolectó quince (15) eyaculados de perros Sin Pelo del Perú machos, mediante la técnica de manipulación digital.

Para realizar esta técnica, solo se necesitó hacer estímulo en el pene del perro y hacer presión con la mano del recolector, para lograr la erección y posteriormente el eyaculado, que fue recolectado en un vaso precipitado.

3.3 Evaluación básica.

- Volumen

Se recolectó en un vaso precipitado de 50 mL, y posteriormente se pasó a una probeta graduada para medir el volumen en mL.

Se mantuvo la muestra a temperatura ambiente, que tenía el rango de 15°C - 18°C. Una vez que llegaba la muestra al laboratorio, se colocaba en una estufa que tenía una temperatura de 38°C.

- Color

Para caracterizar el color, se tomó como referencia los colores mencionados por los diferentes autores que se menciona en la bibliografía (Angulo, 2011 y Stornelli y De la Sota, 2008).

Se tuvo como colores principales: Blanco anacarado, blanquecino, blanco oscuro. Se registró el color que se observó.

- Motilidad

En el aspecto microscópico para la evaluación de la motilidad se retiró 10 μL de cada muestra de semen eyaculado, y se colocó sobre una lámina porta objeto temperada a 38 °C. Se cubrió con una lámina cubre objeto y se observó en el microscopio con un objetivo 40X la motilidad.

- Concentración

La evaluación de la concentración espermática fue realizada diluyendo 1:20 con agua. Se recuperó 10 μL de cada dilución y se hizo una lectura en la cámara de Neubauer a 40X, realizando el conteo de 5 cuadrantes (extremos y medio). El número de espermatozoides se multiplica por 10^6 y fue expresado en número de espermatozoides $\times 10^6/\text{mL}$.

3.4 Evaluación de la funcionalidad.

- Viabilidad

Para la evaluación de la viabilidad se utilizó LIVE/DEAD® Sperm Viability Kit (L-7011, Molecular Probes, Inc.) que contiene: SYBR-14 e Ioduro de Propidio. Se preparó una solución Stock de SYBR-14, para llegar a una concentración de 20 μM .

Se tomó 100 μL de muestra. Se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml, luego se agregó 0.5 μL de Solución Stock de SYBR-14 (20 μM), para obtener una concentración final de 100 nM de SYBR-14. Se puso a incubar durante 10 minutos a 38 °C. Adicionalmente se colocó 0.5 μL de solución Stock de Ioduro de Propidio (2.4 nM), para llegar a una concentración final de Ioduro de Propidio de 12 μM y se puso a incubar por 10 minutos. Se consideró espermatozoides vivos a aquellos que presenten fluorescencia verde (SYBR-14) y muertos, a aquellos que presenten fluorescencia roja (PI).

Las muestras fueron evaluadas mediante citometría de flujo utilizando un equipo que tiene un sistema de analizador de imágenes. Se realizó la lectura de diez mil eventos. Para la excitación del SYBR-14, Ioduro de Propidio y FITC-PSA, se utilizó un láser de longitud de onda de 488 nm. La emisión de la fluorescencia

para el SYBR-14, fue leída utilizando el canal de detección Ch02 (505 – 560 nm), la emisión de la fluorescencia para el Ioduro de Propidio, fue leída utilizando el canal de detección Ch05 (642 – 740 nm).

Cada población, para la viabilidad espermática, fue definida gracias al sistema analizador de imágenes, que tiene el citómetro de flujo. Estas poblaciones fueron separadas o diferenciadas de forma manual y visual, de acuerdo a la fluorescencia que presentaban los espermatozoides.

- Potencial de membrana mitocondrial

Para evaluar potencial de membrana mitocondrial, se utilizó Mito Tracker Deep Red 633 (M22425, Molecular Probes, Estados Unidos). Se tomó 100 μ L de muestra y se agregó 0.5 μ L de solución de trabajo de Mito Tracker Deep Red 633 (20 μ M), se obtuvo una concentración final de 100 nM y se incubó durante 10 minutos a 38 °C en oscuridad. Se consideró espermatozoides con actividad mitocondrial aquellos que presentaron fluorescencia roja. Los resultados fueron expresados en porcentaje de espermatozoides con actividad mitocondrial.

Las muestras fueron evaluadas mediante citometría de flujo utilizando un equipo que tiene un sistema de analizador de imágenes. Se realizó la lectura de diez mil eventos. Para la excitación del Mito Tracker Deep Red 633 se utilizó un láser de longitud de onda de 642 nm. La emisión de fluorescencia para Mito Tracker Deep Red 633, fue leída utilizando el canal de detección Ch11 (642 – 740 nm).

Cada población, para el potencial de membrana mitocondrial; fue definida gracias al sistema analizador de imágenes, que tiene el citómetro de flujo. Estas poblaciones fueron separadas o diferenciadas de forma manual y visual, de acuerdo a la fluorescencia que presentaban los espermatozoides.

- Integridad Acrosomal

Para evaluar la integridad acrosomal se usó la solución Isoticionato de fluoresceína conjugado Pisum Sativum (FITC-PSA). Para el control de vivos/muertos, se usó el Yoduro de Propidio. Cada muestra de 100 μ L fue incubada por 10 minutos a 38°C de la siguiente manera: 100 μ L de semen fueron incubados en 2.5 μ L de solución de Stock de FITC-PSA (100 μ g/ml), para llegar a una concentración final de 2.5 μ g/ml de FITC-PSA. Adicionalmente se le añadió

0.5 μ L de solución de Stock de yoduro de Propidio (1mg/ml), para llegar a una concentración final de 5 μ g/ml. Se consideró espermatozoides con el acrosoma intacto a aquellos que no presentaron fluorescencia verde (FITC-PSA-negativo), y las muestras que presentaron fluorescencia verde en la región acrosomal (FITC-PSA positivo) fueron espermatozoides con el acrosoma dañado.

Las muestras fueron evaluadas mediante citometría de flujo utilizando un equipo que tiene un sistema de analizador de imágenes. Se realizó la lectura de diez mil eventos. Para la excitación del FITC-PSA, se utilizó un láser de longitud de onda de 488 nm. La emisión de la fluorescencia para el FITC-PSA, fue leída utilizando el canal de detección Ch02 (505 – 560 nm).

Cada población, para la integridad acrosomal; fue definida gracias al sistema analizador de imágenes, que tiene el citómetro de flujo. Estas poblaciones fueron separadas o diferenciadas de forma manual y visual, de acuerdo a la fluorescencia que presentaban los espermatozoides.

3.5 Análisis estadístico.

El estudio fue descriptivo, los resultados del presente estudio fueron expresados en porcentajes y rangos. Las variables fueron presentadas como medias, desviación estándar, coeficiente de variación, intervalo de confianza y percentiles. Estos fueron realizados, utilizando el software GraphPad Prisma® versión 3.0 (San Diego, Usa).

Se utilizó la prueba de Kolmogorov–Smirnov (Test de K-S), para ver si las variables seguían una distribución normal. En el caso que el valor de “P” sea mayor a 0.1, se consideró que sí sigue una distribución normal.

IV. RESULTADOS.

Los datos obtenidos de las muestras evaluadas del espermatoograma básico se observan en el cuadro N°2. Los valores y porcentajes promedios para las características seminales de la raza del perro sin pelo del Perú son: volumen fue de 6 mL, con una desviación estándar de 5.09 y un intervalos de confianza (IC) de 2.78%. Se observó un color blanquecino. Al observar al microscopio, se encontró una concentración de 262.66×10^6 , con una desviación estándar de 36.78×10^6 espermatozoides por mL y un intervalo de confianza de 20.40%. Así mismo la motilidad tuvo 66% de promedio, una desviación estándar de 18.87 y un intervalo de confianza de 10.45%.

Los datos obtenidos para evaluar la funcionalidad, fueron realizados utilizando un citómetro de flujo con sistema analizador de imágenes, adquiriendo 10 mil eventos compatibles con espermatozoides. Los datos obtenidos de las muestras, se pueden observar en el Cuadro N°3, con SYBR-14 e Ioduro de Propidio (viabilidad espermática). Se observó que hubo un promedio de 77% de espermatozoides vivos, que tuvieron una desviación estándar de 17.62% y un intervalo de confianza de 9.76%. En la Figura N°1, se ve un gráfico de puntos representativos de las muestras obtenidas con SYBR-14/PI y en la Figura N°2, se observan imágenes representativas de las muestras evaluadas con SYBR-14/PI. Así mismo, en las muestras evaluadas con Mito Tracker Deep Red FM (Potencial de membrana mitocondrial), los espermatozoides con alto potencial de membrana mitocondrial, tuvieron un promedio de 85%, una desviación estándar de 12.91% y un intervalo de confianza de 7.15%. En la Figura N°3, se ve un Histograma representativo para las muestras obtenidas con Mito Tracker Deep Red FM y en la Figura N°4, se observan imágenes representativas obtenidas con Mito Tracker Deep Red FM. Por último, en las muestras evaluadas con FITC-PSA/PI (integridad acrosomal), con espermatozoides vivos y con el acrosoma intacto tuvieron un promedio de 73%, una desviación estándar de 25.13 y un intervalo de confianza de 13.91%. En la Figura N°5, se ve una gráfica de puntos representativos de las muestras obtenidas con FITC-PSA/PI y, en la Figura N°6, se observa imágenes representativas obtenidas con FITC-PSA/PI.

Cuadro N°2: Valores promedios de los parámetros evaluados del espermatoograma básico del semen del perro sin pelo del Perú, (N=15).

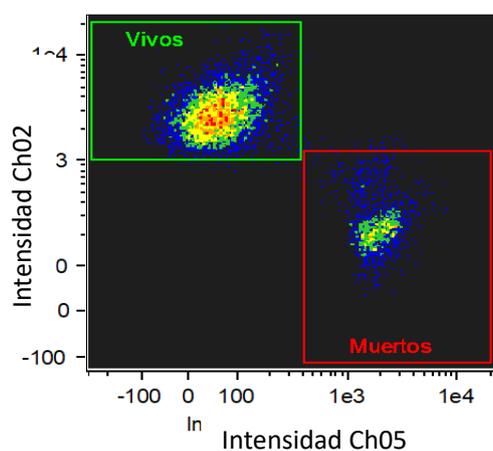
| Variables | Volume n mL | Concentración (10 ⁶ /mL) | Motilidad (%) |
|----------------------------|----------------|--|---------------|
| Promedio | 6.1 | 262.6 | 66.6 |
| Rango | 1-21.5 | 210.0-320.0 | 30-95 |
| Desviación estándar | 5.0 | 36.7 | 18.8 |
| Intervalo de confianza 95% | 2.7 | 20.4 | 10.4 |
| Coeficiente de variación | 81.8 | 14.0 | 28.3 |
| Percentiles | 25% | 3.5 | 235.0 |
| | 50% | 5.0 | 260.0 |
| | 75% | 9.0 | 297.5 |

Cuadro N°3. Valores promedios de los parámetros de funcionalidad del semen del perro sin pelo del Perú, (N=15).

| Variables | Viabilidad % | Potencial de membrana mitocondrial % | Vivos con el acrosoma intacto % |
|-------------------------------|-----------------|--|---------------------------------------|
| Promedio | 77.7 | 85.9 | 73.9 |
| Rango | 39.9-98.3 | 47.6-99.7 | 14-93.1 |
| Desviación estándar | 17.6 | 12.9 | 25.1 |
| Intervalo de confianza 95% | 9.7 | 7.1 | 13.9 |
| Coeficiente de variación | 22.6 | 15.0 | 33.9 |
| Percentiles | 25% | 71.6 | 84.6 |
| | 50% | 84.4 | 87.6 |
| | 75% | 92.5 | 95.1 |

Cuadro N°4. Distribución del porcentaje de la concentración espermática, motilidad espermática, viabilidad espermática, potencial de membrana mitocondrial e integridad acrosomal, (N=15).

| Variable | Test KS | Paso Test de normalidad (P > 0.10) |
|------------------------------------|---------|------------------------------------|
| Volumen | 0.204 | Si |
| Concentración espermática | 0.171 | Si |
| Motilidad espermática | 0.171 | Si |
| Viabilidad espermática | 0.180 | Si |
| Potencial de membrana mitocondrial | 0.249 | Si |
| Integridad acrosomal | 0.303 | Si |



| | |
|---------------------------|------|
| Espermatozoides vivos % | 78 |
| Espermatozoides muertos % | 21.3 |

Figura N°1: Gráfica de puntos representativos de la evaluación de la viabilidad espermática del semen del perro sin pelo del Perú utilizando SYBR-14/PI. Se observan dos poblaciones claramente diferenciadas. En el eje Y se observa la

intensidad del canal Ch02 (SYBR-14) y en el eje X la intensidad del canal Ch05 (PI)

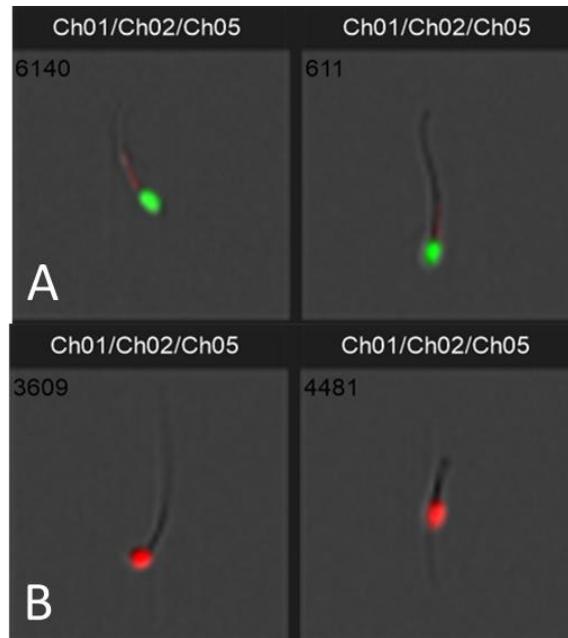
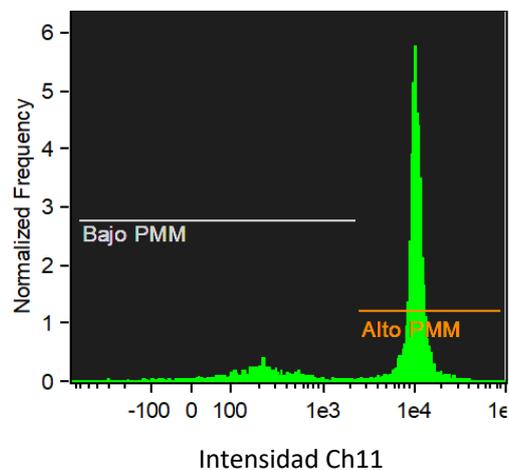


Figura N°2: Imagen de la evaluación de la viabilidad espermática del semen del perro sin pelo del Perú utilizando SYBR -14/PI. A) Los espermatozoides que tienen fluorescencia verde son considerados vivos y son los que reaccionaron a SYBR-14. B) Los espermatozoides que tienen la fluorescencia roja son considerados muertos y son los que reaccionaron a PI. Siendo Ch01 el canal número 1, Ch02 el canal número 2 y Ch05 el canal número 5.



| | |
|--------------------------------|------|
| Espermatozoides con alto PMM % | 84.3 |
| Espermatozoides con bajo PMM % | 15.7 |

Figura N°3: Histograma representativo de la evaluación del potencial de membrana mitocondrial espermática del semen del perro sin pelo del Perú utilizando Mito tracker Deep red FM. Se observan dos poblaciones claramente definidas. En el eje Y se observa la intensidad del canal Ch11 (MDR).

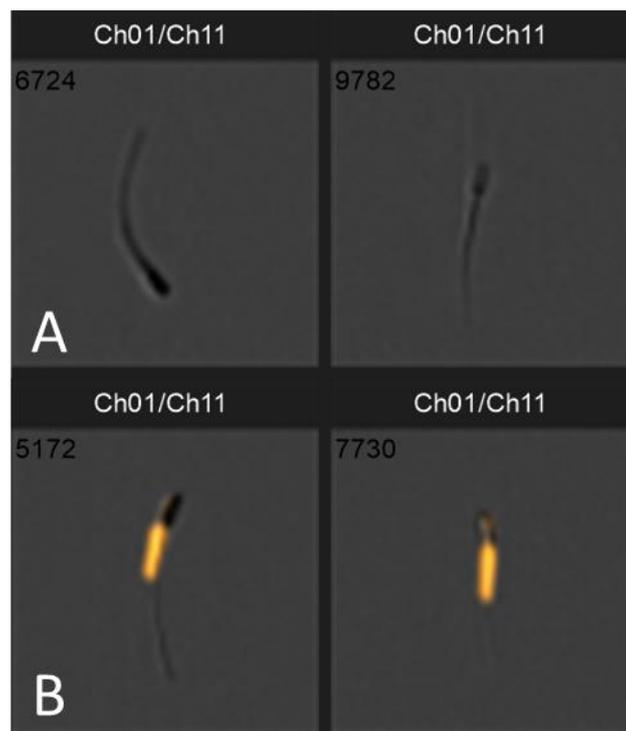
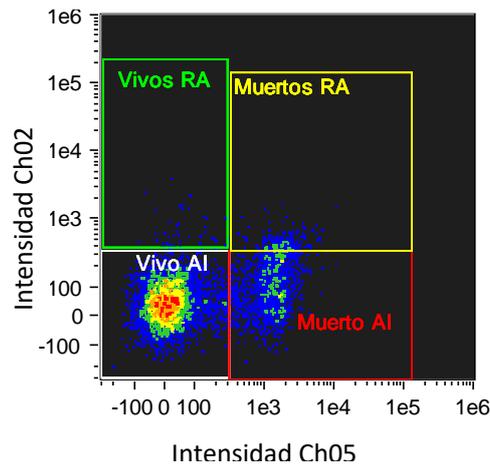


Figura N°4: Imagen de la evaluación del potencial de membrana mitocondrial espermática del semen del perro sin pelo del Perú, utilizando Mito tracker Deep red FM, A) Los espermatozoides que no presentaron fluorescencia color naranja, son considerados que tienen bajo potencial de membrana mitocondrial, B) Los espermatozoides que presentaron fluorescencia color naranja, son los que tienen alto potencial de membrana mitocondrial y que reaccionaron al MDR. Siendo Ch01 el canal número 1 y Ch11 el canal número 11.



| | |
|---|-------|
| Espermatozoides vivos con reacción acrosomal % | 0.50 |
| Espermatozoides muertos con reacción acrosomal % | 2.88 |
| Espermatozoides vivos con el acrosoma intacto % | 75.00 |
| Espermatozoides muertos con el acrosoma intacto % | 21.00 |

Figura N°5: Grafica de puntos representativos de la evaluación de la integridad acrosomal espermática del semen del perro sin pelo del Perú utilizando FITC-PSA/PI, se observan 4 poblaciones claramente definidas. En el eje Y se observa la intensidad del canal Ch02 (FITC-PSA) y en el eje X se observa la intensidad del canal Ch05 (PI).

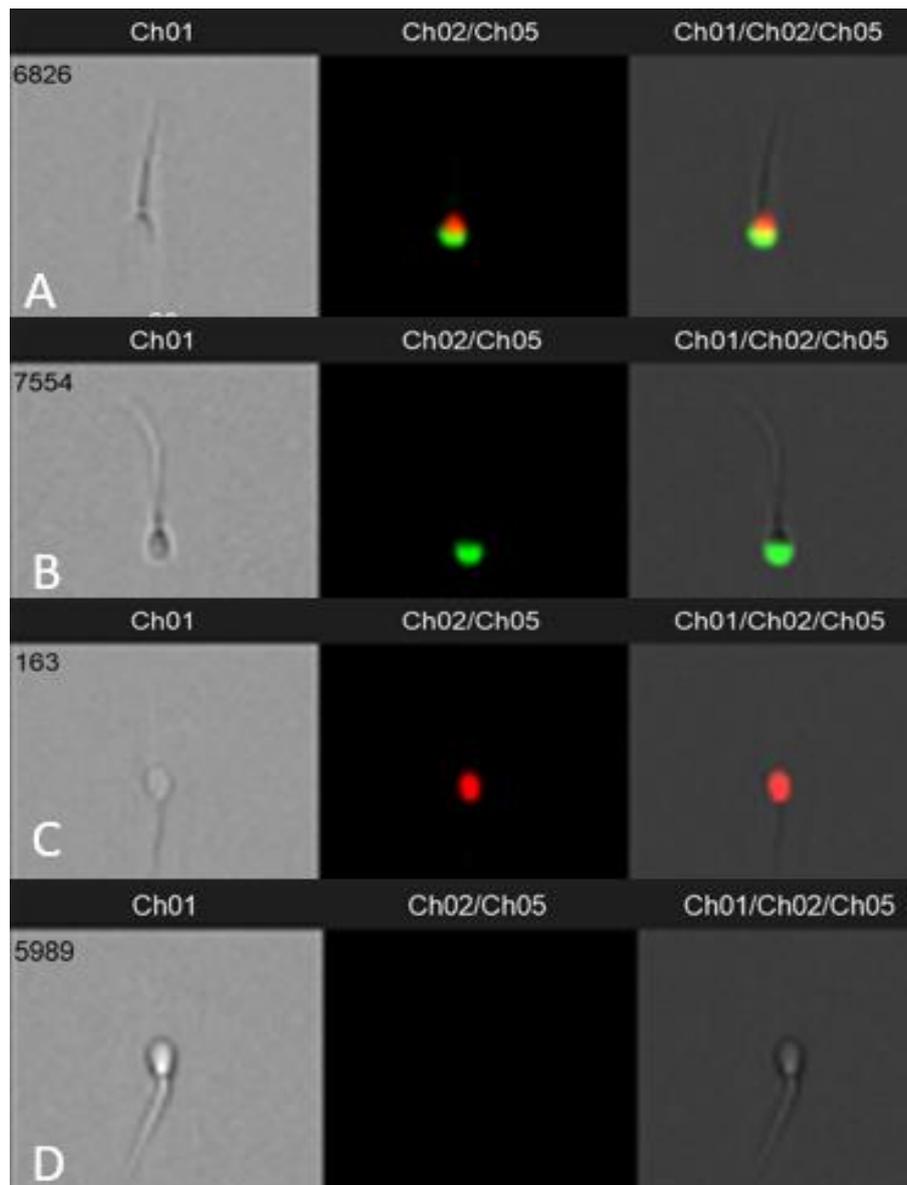


Figura N°6: Imagen de la evaluación de la integridad acrosomal espermática del semen del perro sin pelo del Perú utilizando FICT-PSA/PI. A) Los espermatozoides que presentan fluorescencia verde más roja, son considerados muertos y con el acrosoma dañado y reaccionaron a FITC-PSA/PI. B) Los espermatozoides que presentan solo fluorescencia verde, son considerados vivos y con el acrosoma dañado y reaccionar a FITC-PSA. C) Los espermatozoides que presentan solo fluorescencia roja, son considerados muertos y con el acrosoma intacto y reaccionaron a PI. D) Los espermatozoides que no presentan ninguna fluorescencia, son considerados vivos y con el acrosoma intacto. Siendo Ch01 el canal número 1, Ch02 el canal número 2 y Ch05 el canal número 5.

V. DISCUSIÓN

La característica del semen de la especie canina es muy variable y esto depende de la raza, tamaño del perro, estado de salud, edad y el grado de excitación en el que se encuentre el individuo (Angulo, 2011). Este es el primer trabajo de investigación donde se obtuvo algunos valores de las características seminales del perro sin pelo del Perú.

El color del semen del perro sin pelo del Perú fue 100% blanquecino. Sin embargo, esto va a depender mucho de otros factores como son: volumen del eyaculado, concentración de espermatozoides, si el perro cursa con alguna enfermedad y la frecuencia con la que se recolecta el semen (Angulo, 2011; Tello et al, 1988).

Se obtuvo un valor promedio de $6.13 \text{ mL} \pm 5.01\%$ de volumen de eyaculado, este valor es menor al encontrado en la raza Pastor Alemán que tiene un promedio de $22.91 \text{ mL} \pm 14.47\%$ de eyaculado (Tello et al, 1988). Esta diferencia encontrada podría deberse básicamente al factor raza, peso y tamaño del perro; ya que un canino de mayor peso y tamaño, tiene la única glándula accesoria del sistema reproductor más grande. Siendo que, perros pequeños con un peso menor de 8kg, el tamaño de su próstata es de $2.14 \pm 0.43 \text{ cm}$; perros medianos con pesos menores de 18kg, el tamaño de la próstata es de $2.90 \pm 0.98 \text{ cm}$ y perros grandes con pesos mayores a 18kg, el tamaño de la próstata es de $3.44 \pm 0.72 \text{ cm}$. (Miguel de Priego, 2007).

Al ser la próstata la única glándula accesoria en el perro que brinda el líquido seminal, entendemos que perros de razas grandes tendrán mayor volumen seminal, como es el caso del Pastor Alemán. Pero el valor obtenido en el trabajo de investigación se encuentra dentro del rango normal para la especie que va desde 2.5 ml – 80 mL (Gradil et al, 2006)

La concentración espermática que se registró en este estudio tuvo como promedio $262.7 \times 10^6 \pm 36.78 \times 10^6$ espermatozoides por mL, esta cifra es mucho mayor a la descrita en otras razas como el Pastor Alemán $87.45 \times 10^6 \pm 65.15 \times 10^6$ espermatozoides por mL (Tello et al, 1988). Estas variaciones en las cifras, pueden estar influenciada por la raza, tamaño, peso del perro y por el volumen del eyaculado; ya que a mayor cantidad de líquido seminal, la muestra se

encuentra más diluida y, por lo tanto, la muestra va a tener una menor concentración. El valor obtenido en este estudio se encuentra dentro del rango normal para la especie que va desde 4- 400 x 10⁶ espermatozoides por mL (Gradil et al, 2006).

La motilidad que se encontró en este estudio alcanzo un promedio de 66.67% ± 18.87%, lo que es menor a otros valores encontrados en otros estudios, como los descritos en las razas: Golden Retriever con 85.4% ± 1.8% (Perez et al, 2012), Dogo Canario 90.6% ± 0.3 (Alamo-Santana et al, 2007), pero son ligeramente mayores a los valores encontrados en las razas Cimarron Uruguayo 64,2% ± 4.9%(Fernandez, 2016), Pastor Aleman 65% ± 29.91% (Tello et al, 1988).

Estas diferencias encontradas en los promedios, puede deberse a la forma de colección, la raza y al tiempo en que se realizó el análisis de esta variable, ya que es muy importante, debido a que este parámetro nos permite valorar si el espermatozoide puede llegar al óvulo y fertilizarlo (Altamirano y Pereira, 2011).

En los estudios mencionados el análisis se realizó minutos después de la colección, mientras que el análisis que se realizó en este trabajo de investigación tuvo un tiempo de mayor demora, debido al traslado, (Gradil et al; 2006). Se menciona que el valor de la motilidad para la especie debe ser mayor a 70% de motilidad, y cabe mencionar que este valor se da de una forma subjetiva.

La viabilidad espermática en este estudio fue analizada mediante citometría de flujo y tuvo un valor promedio de 77.74% ± 17.62%. Este valor encontrado, está en el rango reportado para otras razas caninas como el Chihuahua que tiene un promedio de 62.74% ± 13.92% (Salinas et al, 2014), el Golden Retriever, el Labrador y el Pastor Alemán que tienen un promedio de 82.66% ± 2.8% de espermatozoides viables con membrana plasmática íntegra (Cheuqueman et al, 2012).

El promedio encontrado para este parámetro nos da a entender que tiene una buena capacidad fecundante, ya que la integridad de membrana plasmática es muy importante para algunas funciones metabólicas de los espermatozoides como: capacitación, reacción acrosomal e interacción con la zona pelúcida (Salinas et al, 2014).

Este valor también va a depender mucho de la forma de colección, traslado, almacenamiento y el tiempo en el que se procesa la muestra; pues los espermatozoides que no tengan la membrana plasmática íntegra, se consideran espermatozoides que no tienen la capacidad de poder fecundar un ovocito, y mantener la membrana plasmática intacta es muy importante para la sobrevivencia del espermatozoide en el aparato reproductor de la hembra (Salinas et al, 2013).

El potencial de membrana mitocondrial de los espermatozoides en esta investigación fue de $85.95 \% \pm 12.91\%$. Este parámetro también fue analizado mediante citometría de flujo. Se encontró valores similares reportados en las razas Pastor Aleman, Golden Retriever y Labrador Retriever que tuvieron un promedio de $84.5\% \pm 7.1\%$ (Treulen, 2012).

Este parámetro es un indicador sensible del estado de funcionalidad de las mitocondrias. Existe una relación entre la motilidad y el estado mitocondrial, ya que las mitocondrias son las productoras de ATP, producidas por la fosforilación oxidativa. Esto es importante para que pueda ocurrir una correcta actividad celular como la motilidad (Salinas et al, 2013). Las mitocondrias son las organelas más importantes para evaluar la calidad de un espermatozoide (Allauca, 2017).

Espermatozoides vivos y con el acrosoma intacto en esta investigación tuvo un valor promedio de $73.95\% \pm 25.13\%$, analizado mediante citometría de flujo, este valor que se halló en la presente investigación, se encuentra dentro del rango reportado para otras razas como el Golden Retriever, que tiene un promedio de $67.5\% \pm 3.9\%$ de espermatozoides con el acrosoma intacto (Perez et al, 2012), Pastor Alemán y Labrador, que tuvieron un valor promedio de $97.5\% \pm 1.3\%$ (Treulen, 2012).

Este parámetro es de mucha importancia, ya que solo los espermatozoides que tengan el acrosoma intacto pueden realizar la reacción acrosomal, porque solo ellos van a tener la capacidad de atravesar la zona pelúcida y unirse con este y formar un embrión (Cabrera y Pantoja, 2012).

El uso de la microscopía es una técnica muy sencilla de bajo costo, no necesita un ambiente específico, pero los valores que nos brindan son muy subjetivos y

dependen mucho de la persona que los interpreta, demora más tiempo (Ugarelli, 2016). En este trabajo se usó la citometría de flujo para 3 caracteres que son fundamentales para evaluar la capacidad fecundante de los espermatozoides y, de esta forma, obtener valores más seguros y confiables para la caracterización del semen del Perro sin Pelo del Perú.

Los valores promedios encontrados, que fueron analizados mediante citometría de flujo, son porcentajes más altos en comparación con otras razas de perros reportadas. Se podría decir, que el perro sin pelo del Perú tiene un alto porcentaje de espermatozoides vivos con una membrana íntegra, con un alto potencial de membrana mitocondrial y que tienen el acrosoma intacto. Todos estos valores nos podrían indicar que la raza del perro sin pelo de Perú tiene una alta capacidad fecundante, ya que estos parámetros: viabilidad, PMM e integridad acrosomal, son importantes para el proceso de fertilización como lo menciona (Cabrera y Pantoja, 2012).

El valor de P para los parámetros como: volumen, concentración, motilidad, viabilidad espermática, PMM e integridad acrosomal, son mayores a 0.10, esto nos indica que los datos de los parámetros mencionados, siguen una distribución normal. También se halló la desviación estándar, el cual nos indica qué tan dispersos están los datos con respecto al promedio, como por ejemplo, el volumen seminal es de 6.13 ± 5.01 mL.

El coeficiente de variación también nos indica qué tan dispersos están los datos respecto a su media, es muy importante analizar este porque nos indica o sirve para comparar la variabilidad de los caracteres. Por ejemplo, el volumen seminal tiene un coeficiente de variación de 81.84 %, en comparación de la concentración espermática que tiene 14%, esto nos dice que el volumen tiene mayor dispersión o los valores del volumen son más heterogéneos que el de la concentración. Esto puede darse básicamente por el nivel de excitación, perros excitados suelen secretar más líquido seminal.

También se halló los rangos para cada parámetro indicando cual era el mínimo y máximo que se había encontrado para cada parámetro evaluado, como por ejemplo el volumen seminal que tiene un rango de 1 – 21.5 mL de volumen seminal. Los percentiles o cuartiles son: Q1 = 25%, Q2 = 50% y Q3 = 75%. Estos

ordenan un parámetro en 4 partes iguales, como por ejemplo: el Q1 nos dice que el 25% de los datos para el potencial de membrana mitocondrial son menores o iguales a 84.6; el Q2 o mediana nos dice que la mitad de los valores es menor o igual que 87.60 y la otra mitad son mayores o iguales; y el Q3 nos dice que el 75% son menores o iguales que 95.15.

Las diferencias encontradas en esta investigación y los reportados por la literatura pueden deberse al efecto de la raza, como también al tipo de crianza, el manejo sanitario, el tamaño de los perros y la edad.

VI. CONCLUSIONES

Las características seminales se encuentran dentro de los valores normales para la especie, estos resultados representan el primer reporte sobre las características seminales de esta raza y podrían constituir una base para futuras investigaciones orientadas a la preservación del perro sin pelo del Perú.

VII. RECOMENDACIONES

Se recomienda que se haga investigaciones o trabajos de criopreservación del semen del perro sin pelo del Perú, para poder observar cuánto se alteran los valores de una muestra fresca.

Si se va a realizar una evaluación del semen de un perro, es necesario tener en consideración el tiempo en que se va realizar el análisis, ya que este es un factor muy importante y puede alterar algunos resultados en los parámetros evaluados.

Para un mejor manejo y estimulación del macho, es necesario contar con una perra en celo, con lo cual, se pueda estimular el olfato y el gusto y de esta forma obtener un eyaculado de mejor calidad.

Se puede utilizar estos valores como referencia para mejorar los criterios de selección de un macho reproductor.

VIII. BIBLIOGRAFÍA:

1. Alamo-Santana, D., Gonzales-Valle, F., Rodriguez-Dorta, N., Cabrera-Maritn, F. y Gracia-Molina, A. (2007). Influencia de la técnica de congelación (nitrógeno líquido versus ultracongeladores de $-152\text{ }^{\circ}\text{C}$) y variación individual sobre la calidad seminal en el Dogo Canario. *Revista Electrónica de Clínica Veterinaria RECVET*, (2): 57-82.
2. Allen, E. (1992). *Fertility and obstetrics in the dog*. Blackwell Scientific publications limited. Pag: 1-175.
3. Allauca, P. (2017). Determinación del potencial de membrana mitocondrial mediante citometría de flujo durante el proceso de criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca. (Tesis de grado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú.
4. Amaya, F. (2012). Modificación de la técnica Chill 5 para la preservación del semen canino. (Tesis de grado). División Regional de Ciencia Animal, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Mexico.
5. Andrade, A.C. (2005). Influencia en la calidad espermática de la adición de distintas concentraciones de crioprotectores para la conservación del semen canino. (Tesis de doctorado). Universidad Complutense de Madrid, España.
6. Angulo, S. (2011). *Reproducción y neonatología canina y felina*. Montería-Colombia: Servet.
7. Altamirano, L., Pereira, P. (2011). Evaluación del semen canino fresco y congelado, en un perro de raza pitbull terrier, utilizando tres diluyentes en la clínica veterinaria los Andes de Quito. (Tesis de grado). Universidad Estatal de Bolívar, Ecuador.
8. Bird, RMK. (1990) ¿Cuáles son las posibilidades de encontrar maíz en el Perú antes del año 1000 aC? *American Antiquity*. Prensa de la Universidad de Cambridge, 55 (4): 828 - 40.
9. Brito, L. F., Barth, A. D. (2003). Bilodeau-Goeseels Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. *Theriogenology*, S.; Panich P. L. & Kastelic, J. P. 60(8): 1539-51.

10. Carlotto, G. (2009). Efecto del momento de adición del glicerol durante la curva de enfriamiento sobre la calidad espermática durante el proceso de criopreservación de semen canino. (Tesis de grado). Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú.
11. Cabrera, P., Pantoja, C. (2012). Viabilidad espermática e integridad del acrosoma en semen congelado de toros nacionales. *Revista de investigaciones veterinarias del Perú*, 23(2): 192-200.
12. Cheuqueman, C., Bravo, P., Treulen, F., Giojalas, L., Villegas, J. y Sanchez, R. (2012). Sperm membrane functionality in the dog assessed by flow cytometry. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(1): 39-43.
13. Cordova, A., Iglesias, A., Espinosa, R., Eulogio, J., Inzunza, J., Juarez, M., Gomez, A., Rodriguez. (2006). B. Aplicación de la citometría de flujo en veterinaria. *Revista Complutense de ciencias veterinarias*. 10(2): 60-73.
14. Cunningham, J., Klein, B. (2009). *Fisiología Veterinaria*. España. Elsevier, Cuarta edición. Pag: 517-524.
15. Davol, P. (2000). *Canine Reproduction Part 4. Reproduction and the male dog*.
16. Edwar, F., Richard N. (2007). *Endocrinología y Reproducción canina*. Buenos Aires, Argentina, Editorial Inter-Medica.
17. Federation Cynologique Internationale. (2013). Estándar-FCI N°310. FCI. Secretaria general.13, Place Albert 1er B- 6530.
18. Fernandez, L., Gallego, C., De la Sota, P.E., Corrada, Y., Gimenez, A. (2015). El Espermograma en la reproducción canina. *Suplemento técnico veterinario-CVPA*, (49): 36-38.
19. Fernandez, M. (2016). Utilización de imagenología y de medidas testiculares para la evaluación del potencial reproductivo en perros de raza cimarrón uruguayo. (Tesis de grado). Universidad de la Republica de Montevideo, Uruguay.
20. Fiestas, G. (2014). Temperatura corporal interna y periférica del Perro sin pelo del Perú. (Tesis de grado). Universidad Alas Peruanas, Perú.
21. Galiana, C., Valencia, J. (2008). *Reproduccion de Animales Domesticos*. Limusa. (3): 487.

22. Gradil, C. M., Yeager, A., Concannon, P. W. (2006). Evaluación de los problemas reproductivos del macho canino. *Recent Advances in Small Animal Reproduction*. Ithaca.
23. Laguado, J. (2007). Aplicaciones de la citometría de flujo en microbiología, veterinaria y agricultura. *Revista de Medicina Veterinaria y Zootecnia de Córdoba*. 12 (2): 1077-1095.
24. Lissette Torres, A. (2012). Crioconservación de semen canino y evaluación de su viabilidad espermática a través de microscopía directa e inseminación artificial (Tesis de grado). Universidad de Cuenca, Ecuador.
25. Maniero, E. (2015). El perro sin pelo del Perú. Una Herencia milenaria. Lima, Perú: Universidad Científica del Sur.
26. Matas, C. (1997). Análisis mediante citometría de flujo de la respuesta de los espermatozoides de verraco a diferentes medios de incubación. (Tesis de grado). Universidad de Murcia, España.
27. Miguel de Priego, C. (2007). Alteraciones prostáticas en caninos determinadas mediante ultrasonografía y citología por aspiración Eco-Guiada. (Tesis de grado). Universidad Peruana Cayetano Heredia, Perú.
28. Muiño, R. (2008). Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas casa y citometría de flujo: identificación de subpoblaciones espermáticas. (Tesis de doctorado). Universidad de Compostela, España.
29. Osorio, J. y Galvez, C. (2015). El Viringo, El Perro sin Pelo del Perú. *Revista de Arquitectura*. (2): 57-81.
30. Paramo, R., Balcazar, J. (2005). Manual de Practicas en Manejo Reproductivo de Perros. Pag: 69-74.
31. Peres, M., Rocha, M., Vannucchi, C., Mendes, C., Cavalcanti, P., Ninchi, M., Ambrosio, C., Miglino, M., Visintin, J. y Avila, M. (2012). Semen analysis of Golden Retriever healthy dogs and those effected by muscular dystrophy. *International Journal Andrology*. (46): 277-282.
32. Pichardo-Reyes, M. (2004). Característica del semen de conejo de una población mexicana de las razas California, Nueva Zelanda y Chinchilla. (Tesis de grado). Universidad Autónoma de Chapingo, México.
33. Reatiaga, O. (2015). Determinación del efecto de dos protocolos de criopreservación sobre la viabilidad de la célula espermática canina para la

- raza Pastor Belga Mallinois. (Tesis de grado). Universidad de la Salle, Colombia.
34. Restrepo G., Vásquez N., Andrés E. (2009). Crio preservación de semen canino y su aplicación en la inseminación artificial. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*. (4): 119-129.
 35. Rijsselaere, T., Van Soom, A., Maes, D. & de Kruif, A. (2002). Use of the Sperm Quality Analyzer (SQA-IIC) for the assessment of dog sperm quality. *Reproduction in Domestic Animals*. (3): 158-63.
 36. Roman A., De Jesus R., Figueroa F., Antonia J., Peña M. (2014). Métodos de extracción de Semen bovino. *REDVET*.
 37. Salinas, P., Sanchez, R., Risopatron, J. (2013). Criopreservación de Espermatozoides caninos a – 80°C. *Int. J. Morphol*. 31(1):217-224.
 38. Salinas, P., Sanchez, R., Risopatron, J., Pezo, F. (2014). Validación de SYBR-14 y 6-CFDA para Evaluar la Viabilidad e Integridad de la Membrana Plasmática en Espermatozoides Caninos de Raza Chihuahua. *International Journal Morphology*. 32(1): 16-21.
 39. Sanchez, A. y Rubilar, J. (2001). Obtención de cachorros mediante inseminación artificial con semen canino refrigerado.: Primera descripción en Chile. *Archivo de medicina veterinaria*. (33): 105-110.
 40. Sanchez, M. (2014). Desarrollo de métodos alternativos de valoración y criopreservación seminal en el delfín mular (*Tursiops truncatus*). (Tesis de doctorado). Universidad de Complutense Madrid, España.
 41. Santana Alamo, D. (2007). Crioconservación y viabilidad espermática en la especie canina: utilización de nitrógeno líquido vs ultracongelador de -152 °C (Tesis de doctorado). Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, España.
 42. Santana, M. (2011). Efecto de variantes aplicadas a los procedimientos tecnológicos en la conservación seminal de la especie canina. (Tesis de doctorado). Universidad de las Palmas de Gran Canaria, España.
 43. Schurman, A. Axer, H., Scheepers, A. (2002). The glucose transport facilitator GLUT8 is predominantly associated with the acrosomal region of mature spermatozoa. *Cell Tissue Res*. 307(2) 237-42.
 44. Sorriba, C. (2005). *Atlas de Reproducción Canina*. Editorial Inter-Medica.
 45. Stornelli, M., De la Sota, R. (2008). *Manual de Reproducción de animales de producción y compañía*. Editorial Universidad de la Plata.

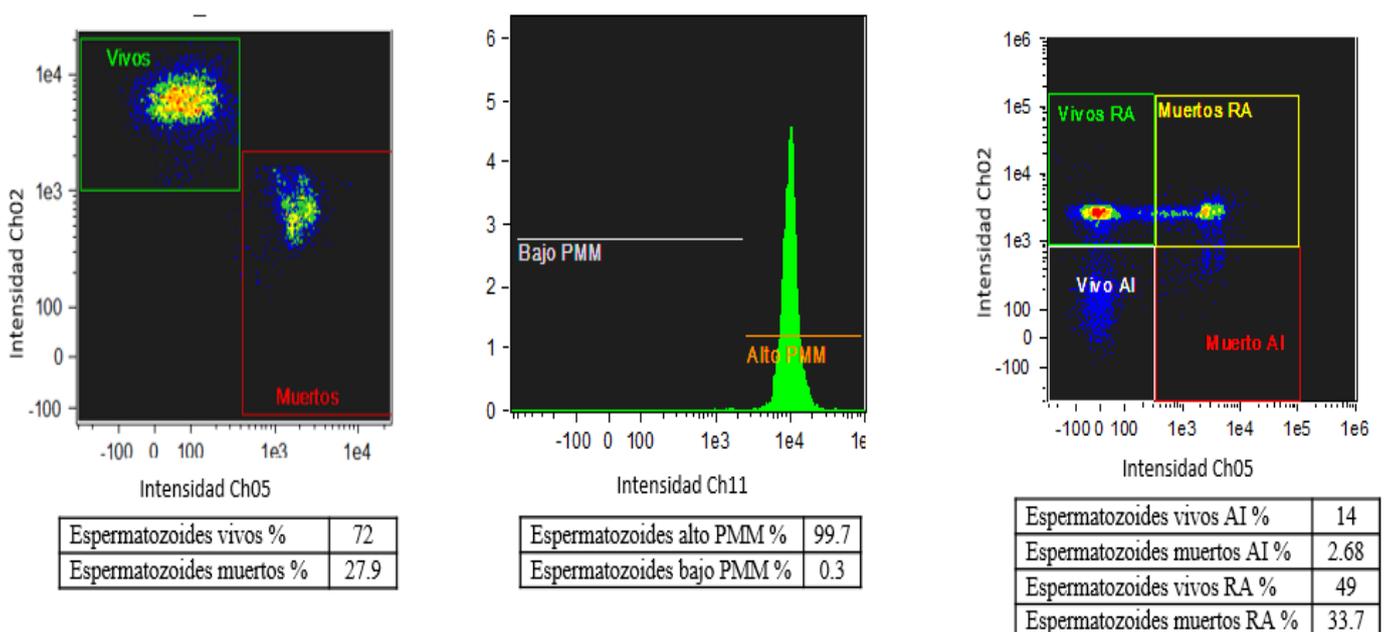
46. Tello L., De los Reyes, M., Bernal, A. (1988). Descripción de algunas características seminales en caninos de raza Ovejero Alemán. *Avances en Ciencias Veterinarias*. (3):52-56.
47. Treulen, F., Sanchez, R., Risopatron, J. (2012). Effects of Seminal Fluid Fractions on Plasma and Acrosome Membrane Integrity and Mitochondrial Membrane Potential Determined by Flow Cytometry in Chilled Canine Spermatozoa.
48. Ugarelli, A. (2016). Determinación del porcentaje de integridad acrosomal en espermatozoides epididimarios de alpaca utilizando las lectinas *Arachis hypogaea* (PNA) y *Pisum sativum* (PSA). (Tesis de grado). Universidad Científica del Sur, Perú.
49. Valadez, R., Mestre, G. (2007). *Xoloitzcuintle del enigma al siglo XXI*. Instituto de investigaciones Atropologicas UNAM.
50. Vasquez V., Rosales T., Galvez C., Dorado, G. (2016). Origen del perro sin pelo del Perú. Pruebas arqueológicas, zooarqueológicas y genéticas. *ARCHAEOBIOS*. 10(1): 80-102.
51. Weiss P. (1970). El perro peruano sin pelo (Perro chino, Viringo, Ccala o Ccalato. *Acta Herediana*; 3(1): 33-54.

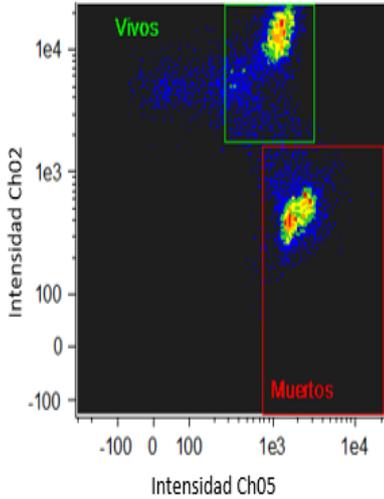
IX. ANEXOS.

Anexo N°1 Cuadro con todos los resultados del espermograma básico y funcionalidad.

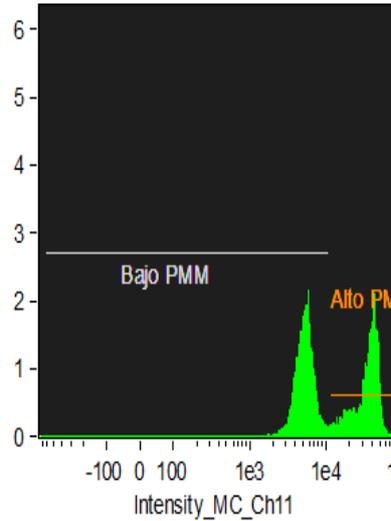
| Análisis de datos de Semen del Perro Sin Pelo del Perú | | | | | | | |
|--|--------------|----------------|--------------|-----------|---------------------|------|------|
| | Macroscopico | | Microscopico | | Citometria de flujo | | |
| Fecha | Volumen | color | Concentraión | Motilidad | Viabilidad | PMM | IA |
| 10/05/2018 | 2 | Blanco lechoso | 295 | 30 | 72 | 99.7 | 14 |
| 10/05/2018 | 5 | Blanco lechoso | 305 | 45 | 46.6 | 47.6 | 17.4 |
| 17/05/2018 | 21.5 | Blanco lechoso | 230 | 60 | 87.4 | 87.6 | 79.9 |
| 17/05/2018 | 4.5 | Blanco lechoso | 210 | 50 | 94.7 | 94.8 | 92.4 |
| 24/05/2018 | 9 | Blanco lechoso | 260 | 85 | 90.4 | 84.3 | 87.2 |
| 21/06/2018 | 4.5 | Blanco lechoso | 210 | 60 | 98.3 | 95.5 | 88.2 |
| 21/06/2018 | 1 | Blanco lechoso | 280 | 95 | 86.1 | 84.9 | 82.6 |
| 21/06/2018 | 5 | Blanco lechoso | 240 | 70 | 76.8 | 71.3 | 78 |
| 5/07/2018 | 6 | Blanco lechoso | 320 | 95 | 39.9 | 97.4 | 61.2 |
| 5/07/2018 | 4.5 | Blanco lechoso | 290 | 55 | 95.1 | 89.9 | 93.1 |
| 12/07/2018 | 6.5 | Blanco lechoso | 220 | 60 | 87.4 | 92.3 | 90.3 |
| 12/07/2108 | 9 | Blanco lechoso | 240 | 90 | 78 | 78 | 75 |
| 12/07/2018 | 9.5 | Blanco lechoso | 300 | 70 | 57.8 | 87.1 | 90.6 |
| 19/07/2018 | 2.5 | Blanco lechoso | 290 | 75 | 84.4 | 87.6 | 85.2 |
| 19/07/2018 | 1.5 | Blanco lechoso | 250 | 60 | 71.2 | 91.3 | 74.2 |

Anexo N°2. Imágenes obtenidas de la evaluación de la viabilidad espermática, potencial de membrana mitocondrial e integridad acrosomal de todas las muestras.

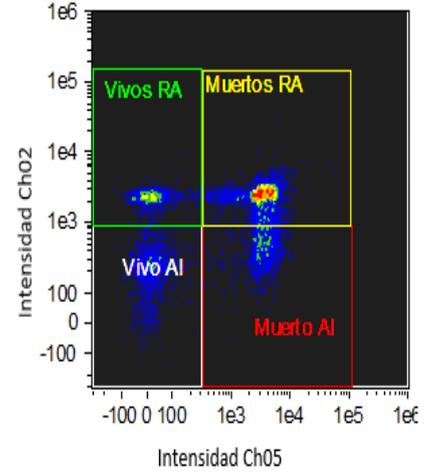




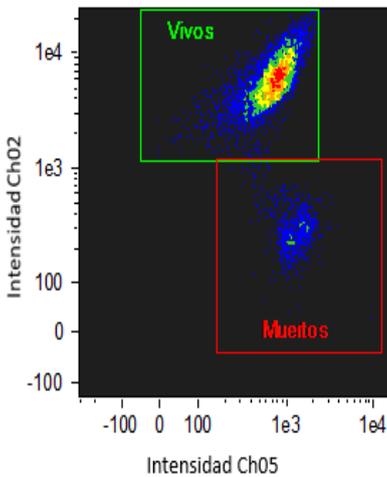
| | |
|---------------------------|------|
| Espermatozoides vivos % | 46.6 |
| Espermatozoides muertos % | 42.3 |



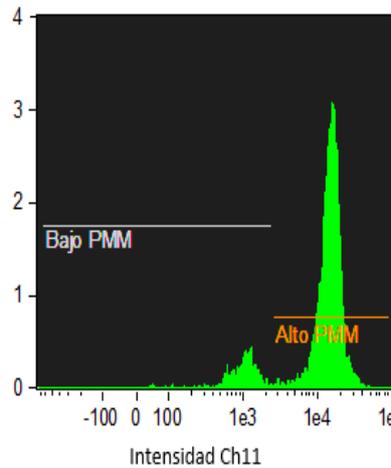
| | |
|----------------------------|------|
| Espermatozoides alto PMM % | 47.6 |
| Espermatozoides bajo PMM % | 52 |



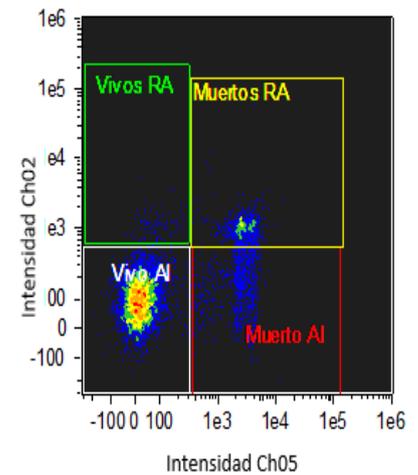
| | |
|------------------------------|------|
| Espermatozoides vivos AI % | 17.4 |
| Espermatozoides muertos AI % | 20.3 |
| Espermatozoides vivos RA % | 14 |
| Espermatozoides muertos RA % | 48.2 |



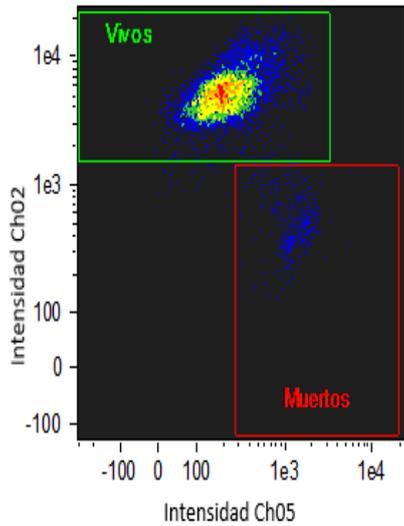
| | |
|---------------------------|------|
| Espermatozoides vivos % | 87.4 |
| Espermatozoides muertos % | 12.5 |



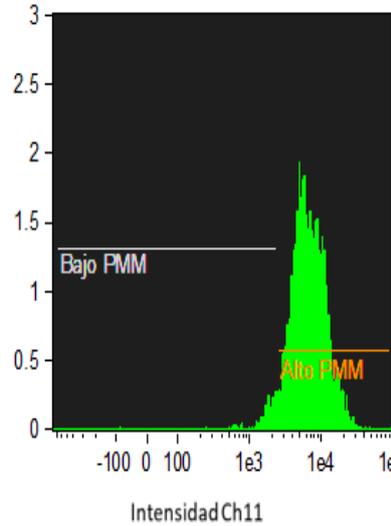
| | |
|----------------------------|------|
| Espermatozoides alto PMM % | 87.6 |
| Espermatozoides bajo PMM % | 12.3 |



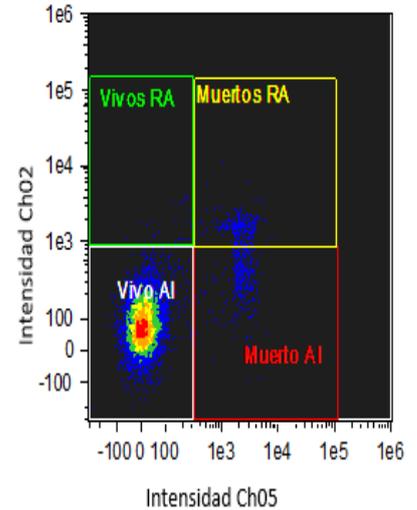
| | |
|------------------------------|------|
| Espermatozoides vivos AI % | 79.9 |
| Espermatozoides muertos AI % | 9.76 |
| Espermatozoides vivos RA % | 0.86 |
| Espermatozoides muertos RA % | 9.34 |



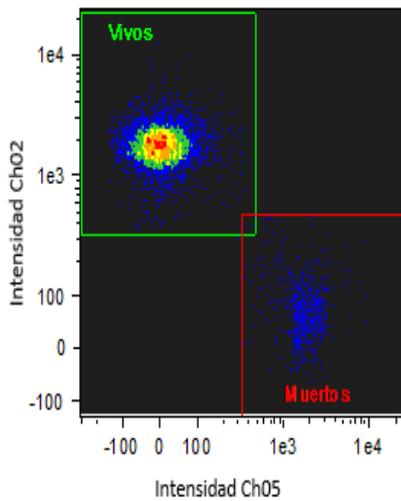
| | |
|---------------------------|------|
| Espermatozoides vivos % | 94.7 |
| Espermatozoides muertos % | 4.78 |



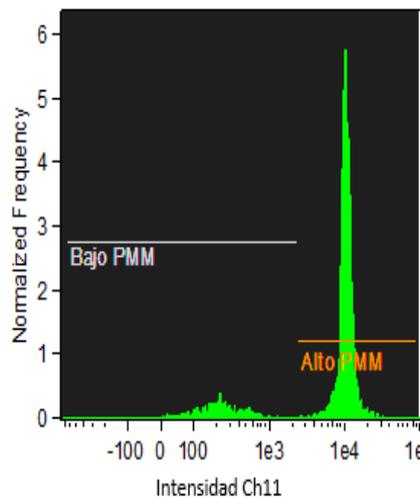
| | |
|----------------------------|------|
| Espermatozoides alto PMM % | 94.8 |
| Espermatozoides bajo PMM % | 4.24 |



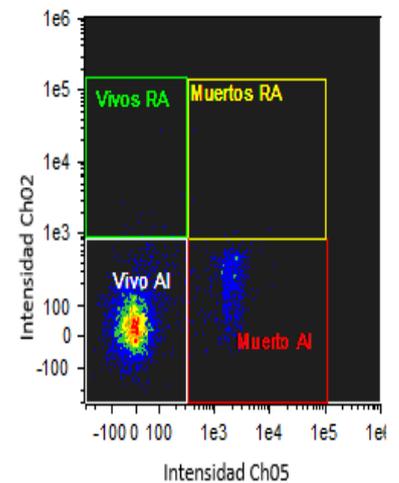
| | |
|------------------------------|------|
| Espermatozoides vivos AI % | 92.4 |
| Espermatozoides muertos AI % | 3.96 |
| Espermatozoides vivos RA % | 0.27 |
| Espermatozoides muertos RA % | 3.24 |



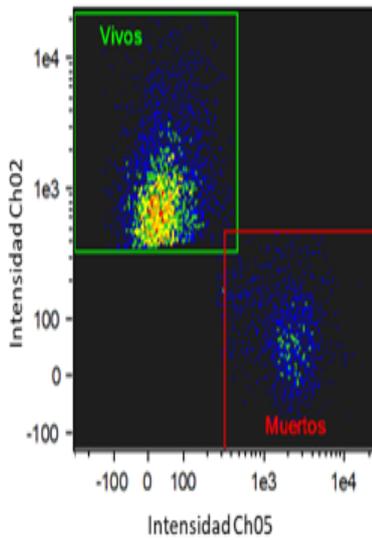
| | |
|---------------------------|------|
| Espermatozoides vivos % | 90.4 |
| Espermatozoides muertos % | 9.64 |



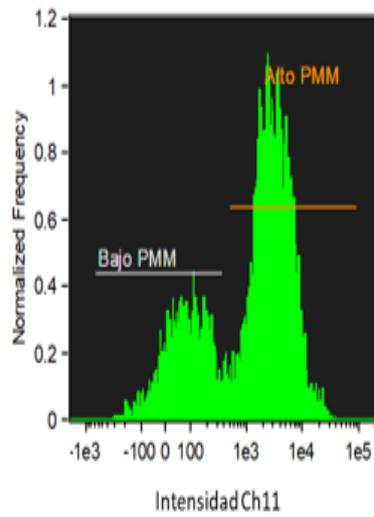
| | |
|----------------------------|------|
| Espermatozoides alto PMM % | 84.3 |
| Espermatozoides bajo PMM % | 15.7 |



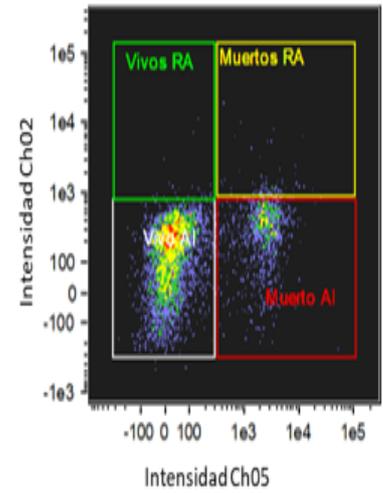
| | |
|------------------------------|------|
| Espermatozoides vivos AI % | 87.2 |
| Espermatozoides muertos AI % | 12.3 |
| Espermatozoides vivos RA % | 0.26 |
| Espermatozoides muertos RA % | 0.13 |



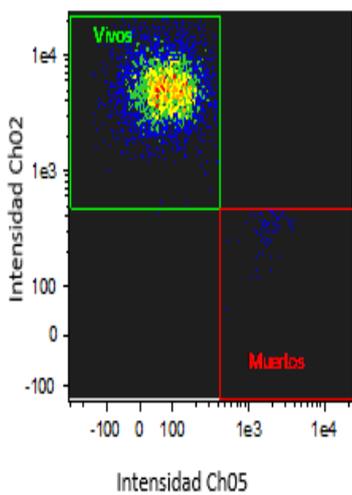
| | |
|---------------------------|------|
| Espermatozoides vivos % | 76.8 |
| Espermatozoides muertos % | 22.7 |



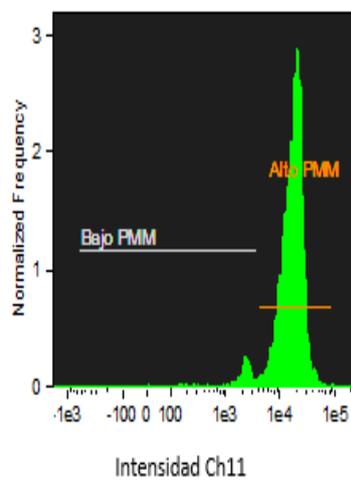
| | |
|----------------------------|------|
| Espermatozoides alto PMM % | 71.3 |
| Espermatozoides bajo PMM % | 27.5 |



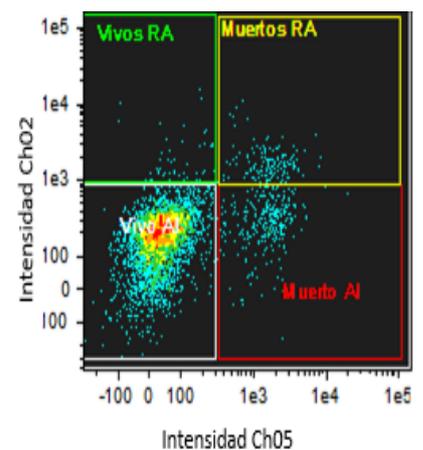
| | |
|------------------------------|------|
| Espermatozoides vivos AI % | 78 |
| Espermatozoides muertos AI % | 19.5 |
| Espermatozoides vivos RA % | 0.31 |
| Espermatozoides muertos RA % | 1.2 |



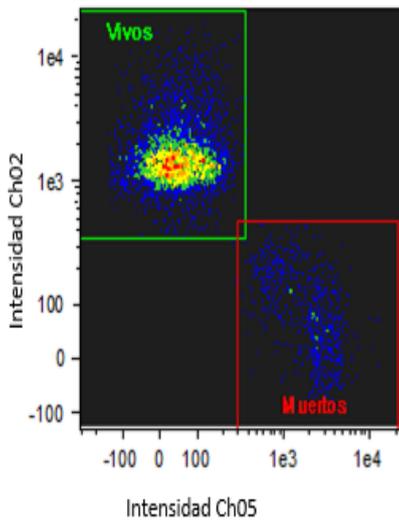
| | |
|---------------------------|------|
| Espermatozoides vivos % | 98.3 |
| Espermatozoides muertos % | 1.69 |



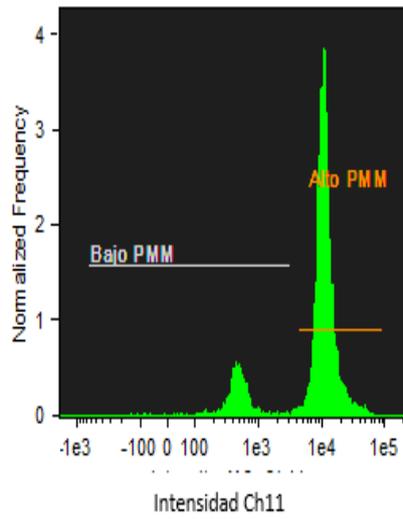
| | |
|----------------------------|------|
| Espermatozoides alto PMM % | 95.5 |
| Espermatozoides bajo PMM % | 4.16 |



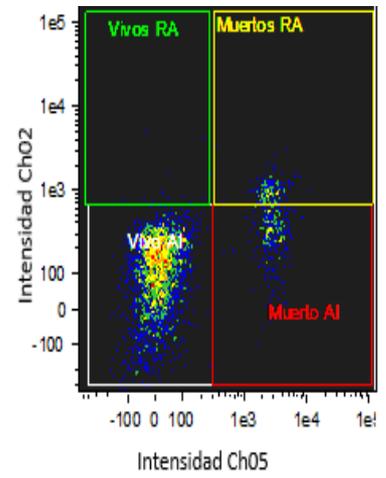
| | |
|------------------------------|------|
| Espermatozoides vivos AI % | 88.2 |
| Espermatozoides muertos AI % | 7.04 |
| Espermatozoides vivos RA % | 1.06 |
| Espermatozoides muertos RA % | 3.46 |



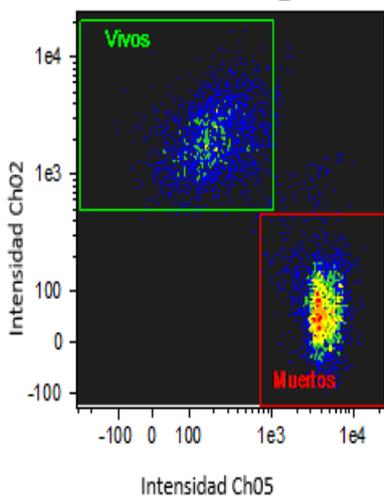
| | |
|---------------------------|------|
| Espermatozoides vivos % | 86.1 |
| Espermatozoides muertos % | 13.8 |



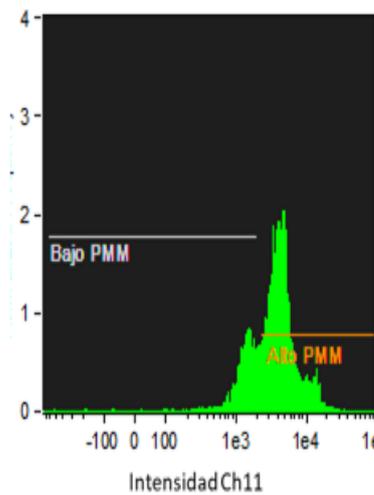
| | |
|----------------------------|------|
| Espermatozoides alto PMM % | 84.9 |
| Espermatozoides bajo PMM % | 14.6 |



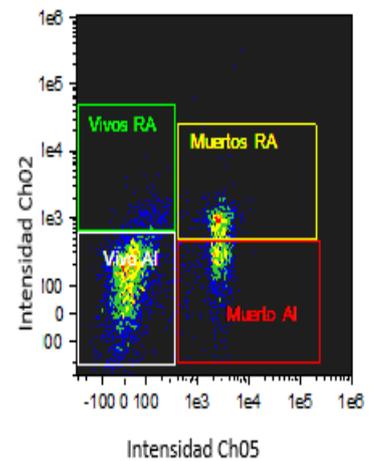
| | |
|------------------------------|------|
| Espermatozoides vivos AI % | 82.6 |
| Espermatozoides muertos AI % | 10.3 |
| Espermatozoides vivos RA % | 0.49 |
| Espermatozoides muertos RA % | 6.31 |



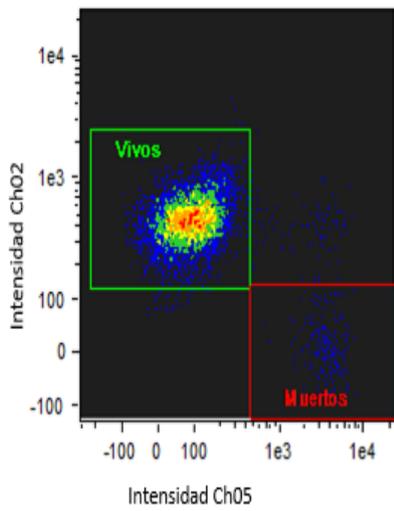
| | |
|---------------------------|------|
| Espermatozoides vivos % | 39.9 |
| Espermatozoides muertos % | 58.1 |



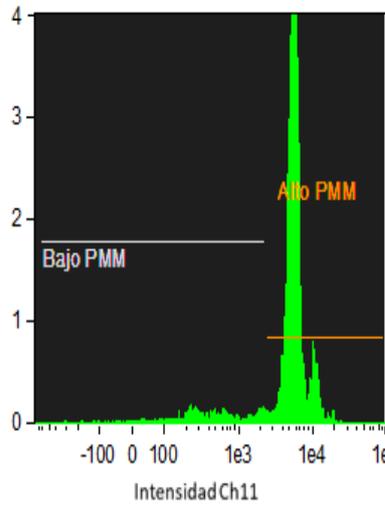
| | |
|----------------------------|------|
| Espermatozoides alto PMM % | 75 |
| Espermatozoides bajo PMM % | 21.8 |



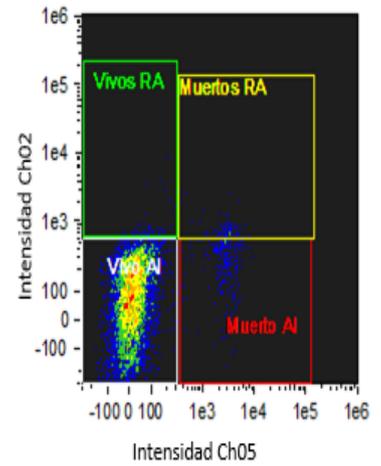
| | |
|------------------------------|------|
| Espermatozoides vivos AI % | 61.2 |
| Espermatozoides muertos AI % | 19.1 |
| Espermatozoides vivos RA % | 3.26 |
| Espermatozoides muertos RA % | 14.8 |



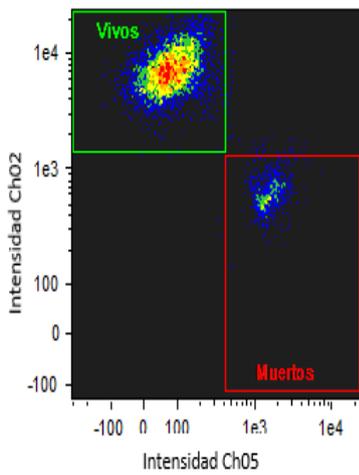
| | |
|---------------------------|------|
| Espermatozoides vivos % | 95.1 |
| Espermatozoides muertos % | 2.91 |



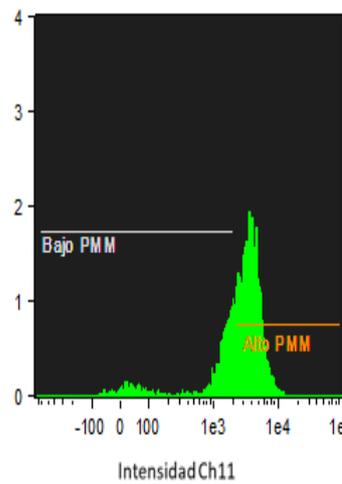
| | |
|----------------------------|------|
| Espermatozoides alto PMM % | 89.9 |
| Espermatozoides bajo PMM % | 9.8 |



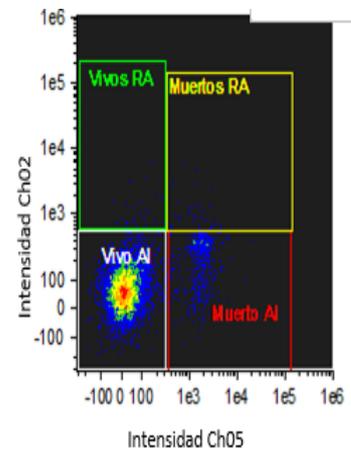
| | |
|------------------------------|------|
| Espermatozoides vivos AI % | 93.1 |
| Espermatozoides muertos AI % | 4.11 |
| Espermatozoides vivos RA % | 0.68 |
| Espermatozoides muertos RA % | 1.28 |



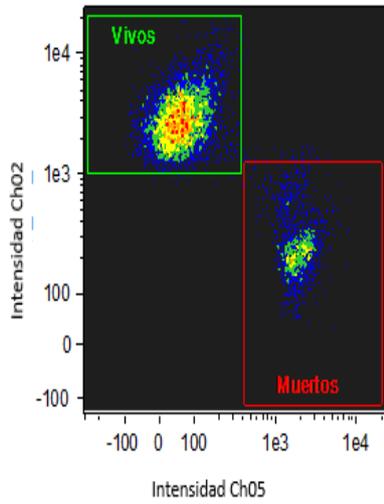
| | |
|---------------------------|------|
| Espermatozoides vivos % | 87.4 |
| Espermatozoides muertos % | 11.4 |



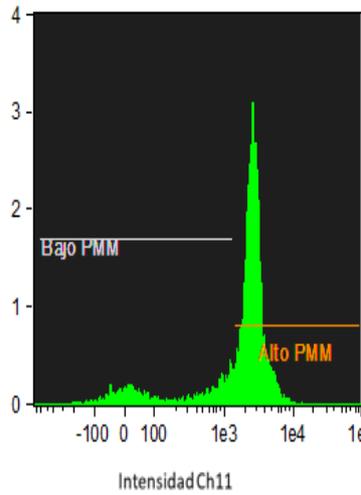
| | |
|----------------------------|------|
| Espermatozoides alto PMM % | 69.1 |
| Espermatozoides bajo PMM % | 27.3 |



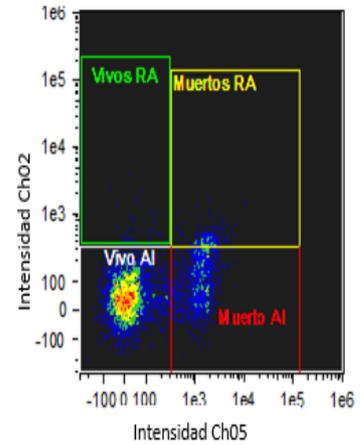
| | |
|------------------------------|------|
| Espermatozoides vivos AI % | 90.3 |
| Espermatozoides muertos AI % | 8.4 |
| Espermatozoides vivos RA % | 0.45 |
| Espermatozoides muertos RA % | 0.6 |



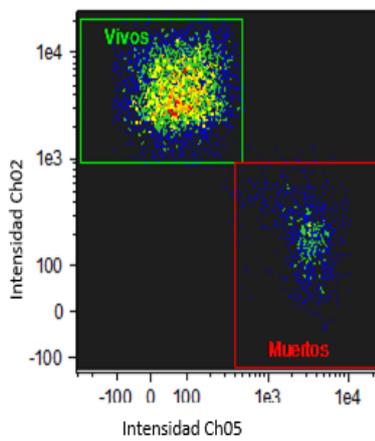
| | |
|---------------------------|------|
| Espermatozoides vivos % | 78 |
| Espermatozoides muertos % | 21.3 |



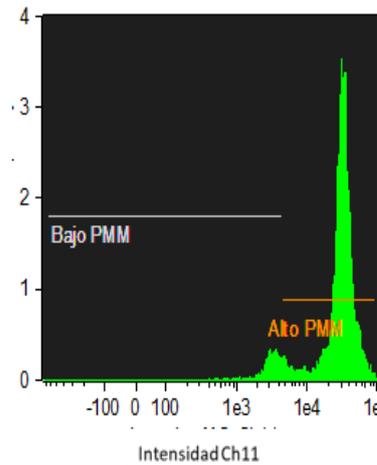
| | |
|----------------------------|------|
| Espermatozoides alto PMM % | 78 |
| Espermatozoides bajo PMM % | 21.4 |



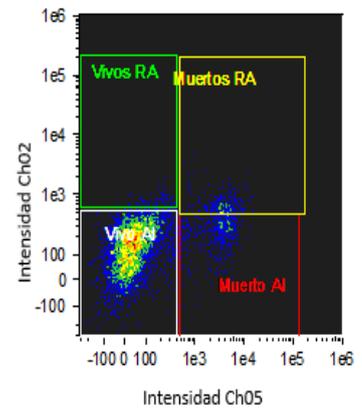
| | |
|------------------------------|------|
| Espermatozoides vivos AI % | 75 |
| Espermatozoides muertos AI % | 21 |
| Espermatozoides vivos RA % | 0.5 |
| Espermatozoides muertos RA % | 2.88 |



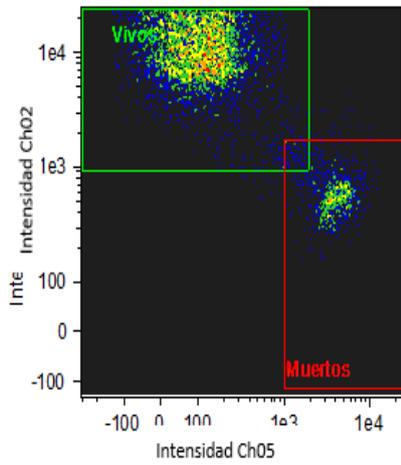
| | |
|---------------------------|------|
| Espermatozoides vivos % | 84.4 |
| Espermatozoides muertos % | 14.8 |



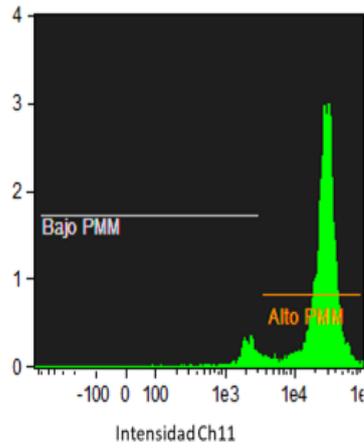
| | |
|----------------------------|------|
| Espermatozoides alto PMM % | 91.5 |
| Espermatozoides bajo PMM % | 7.38 |



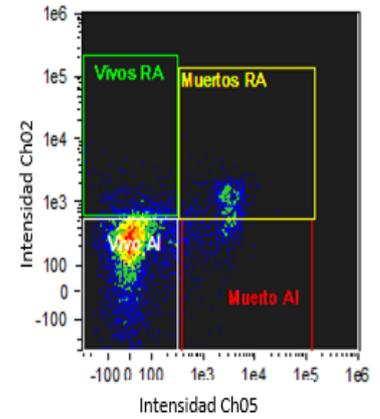
| | |
|------------------------------|------|
| Espermatozoides vivos AI % | 85.2 |
| Espermatozoides muertos AI % | 8.74 |
| Espermatozoides vivos RA % | 0.77 |
| Espermatozoides muertos RA % | 4.68 |



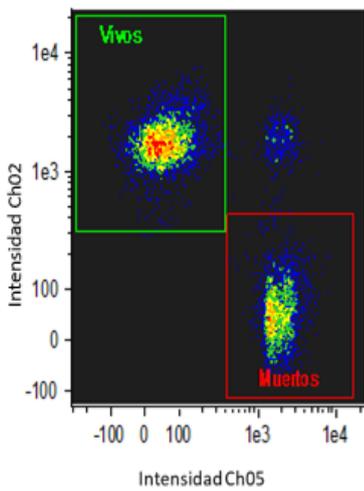
| | |
|---------------------------|------|
| Espermatozoides vivos % | 71.2 |
| Espermatozoides muertos % | 12.9 |



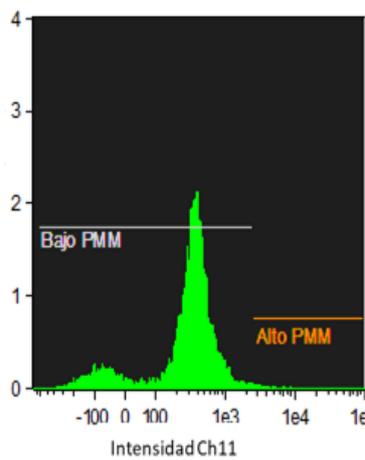
| | |
|----------------------------|------|
| Espermatozoides alto PMM % | 91.3 |
| Espermatozoides bajo PMM % | 8.15 |



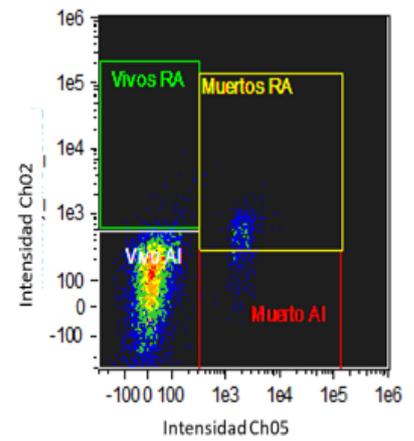
| | |
|------------------------------|------|
| Espermatozoides vivos AI % | 74.2 |
| Espermatozoides muertos AI % | 7.91 |
| Espermatozoides vivos RA % | 5.87 |
| Espermatozoides muertos RA % | 10 |



| | |
|---------------------------|------|
| Espermatozoides vivos % | 57.8 |
| Espermatozoides muertos % | 37 |



| | |
|----------------------------|------|
| Espermatozoides alto PMM % | 87.1 |
| Espermatozoides bajo PMM % | 12.6 |



| | |
|------------------------------|------|
| Espermatozoides vivos AI % | 90.6 |
| Espermatozoides muertos AI % | 2.57 |
| Espermatozoides vivos RA % | 0.88 |
| Espermatozoides muertos RA % | 5.19 |