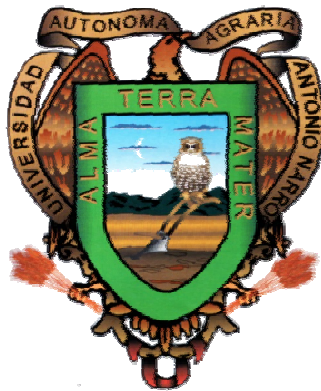


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL**



**“EVALUACIÓN DEL VOLUMEN Y CONCENTRACION DE SEMEN
FRESCO EN COBRADOR DE LABRADOR EN CANINOS DE LA
COMARCA LAGUNERA”.**

TESIS
QUE PRESENTA

JORGE IVAN DE LEÓN GODÍNEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Torreón, Coahuila

Noviembre 2008

Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna

División de Ciencia Animal

“EVALUACIÓN DEL VOLUMEN Y CONCENTRACIÓN DE SEMEN
FRESCO EN COBRADOR DE LABRADOR EN CANINOS DE LA
COMARCA LAGUNERA.”

Tesis

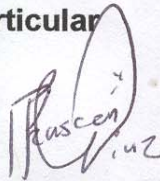
JORGE IVAN DE LEON GODINEZ

Tesis elaborada bajo la supervisión del Comité Particular de Asesoría y aprobada
como requisito parcial para obtener el grado de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

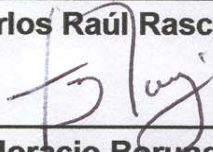
Comité Particular

Presidente:



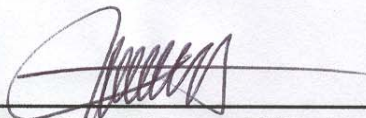
M.V.Z Carlos Raúl Rascón Díaz

Vocal:



I.Z. Jorge Horacio Borunda Ramos

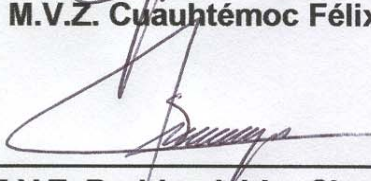
Vocal:



M.V.Z. Cuauhtémoc Félix Zorrilla

Vocal

suplente:



M.V.Z. Rodrigo Isidro Simón Alonso



M.C. José Luis Francisco Sandoval Elías
COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL
DE CIENCIA ANIMAL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

**“EVALUACIÓN DEL VOLUMEN Y CONCENTRACIÓN DE SEMEN
FRESCO EN COBRADOR DE LABRADOR EN CANINOS DE LA
COMARCA LAGUNERA.”**

TESIS

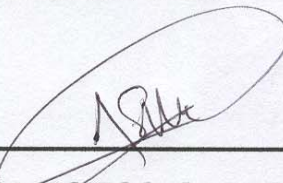
APROBADO POR EL COMITÉ DE TESIS

PRESIDENTE DEL JURADO



MVZ CARLOS RAÚL RASCÓN DÍAZ

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



M.C. JOSÉ LUIS FCO. SANDOVAL ELÍA

AGRADECIMIENTOS

A DIOS:

QUIERO EN ESTA OPORTUNIDAD AGRADECER EN PRIMER LUGAR AL DIOS TODO PODEROSO QUE NOS HA CONSERVADO CON VIDA, CON SALUD, QUE NOS DIO INTELIGENCIA, Y NOS HA GUIADO Y CUIDADO HASTA HOY.

A MIS PADRES:

EN AGRADECIMIENTO A MIS PADRES POR EL APOYO RECIBIDO DURANTE MI FORMACIÓN PROFESIONAL.

PORQUE GRACIAS A SU CARIÑO, GUÍA Y APOYO HE LLEGADO A REALIZAR UNO DE MIS ANHELOS MÁS GRANDES DE MI VIDA, FRUTO DEL INMENSO APOYO, AMOR Y CONFIANZA QUE EN MI SE DEPOSITÓ Y CON LOS CUALES HE LOGRADO TERMINAR MIS ESTUDIOS PROFESIONALES QUE CONSTITUYEN EL LEGADO MÁS GRANDE QUE PUDIERA RECIBIR Y POR LO CUAL LES VIVIRÉ ETERNAMENTE AGRADECIDO. CON CARIÑO Y RESPETO.

A MIS HERMANOS LUIS Y CLAUDIA:

POR MOTIVARME A SALIR ADELANTE Y MOSTRARME SU APOYO, POR QUE EN ELLOS YO DEMUESTRO QUE EN ESTA VIDA TODO SE PUEDE ALCANZAR, Y SE QUE ELLOS SALDRÁN ADELANTE COMO YO. CON CARIÑO.

A MIS FAMILIARES:

POR SUS PALABRAS, CONSEJOS Y SU APOYO. POR QUE GRACIAS A ELLOS UNO SE MOTIVA Y SALE ADELANTE.

A LOS COMPAÑEROS:

GRACIAS A CADA UNO DE MIS COMPAÑEROS, POR VUESTRA SIMPATÍA Y AMISTAD, POR SUS BROMAS QUE CADA DÍA LE DABAN UN MATIZ CÁLIDO A NUESTRA VIDA DE ESTUDIANTE QUE DIOS LOS BENDIGA.

DEDICATORIA

A MI MADRE SOCORRO GODINEZ NAVÁ:

POR HABER SIDO TU, LA QUE INCANSABLEMENTE SIN IMPORTAR LAS DIFICULTADES DE LA VIDA, LUCHO POR HACERME UN HOMBRE DE BIEN, UN HOMBRE PREPARADO. POR HABER CONFIADO EN MI, AUN EN LOS MOMENTOS DE TONTA REBELDÍA. POR HABERME ENSEÑADO EL VALOR Y REALIDAD DE LA VIDA. POR HABERME DADO LA VIDA MISMA... HOY TE AGRADEZCO CON CARÍO.

A MI PADRE ROMEO DE LEON OSORIO:

GRACIAS A TI PADRE, POR SER UN GRAN AMIGO Y APOYARME EN MI CAMINO, GRACIAS POR FORMARME CON TU SABIDURÍA. TUS GRACIAS Y ALEGRÍAS, TUS ENOJOS Y SONRISAS. GRACIAS POR FORMAR ESTA FAMILIA, POR AMAR A MI MADRE Y LA VIDA POR DARMETU CARÍO.

HERMANOS LUIS Y CLAUDIA:

POR SER USTEDES EL PILAR EN EL CUAL ME APOYO CUANDO ESTOY A PUNTO DE FRACASAR. POR ESTAR CERCA DE MI, COMPARTIENDO LAS EXPERIENCIAS MAS IMPORTANTES DE MI CARRERA. PORQUE GRACIAS A SU APOYO HE LLEGADO A REALIZAR UNA DE MIS MEJORES METAS.

INDICE

	Pág.
RESUMEN	1
INTORDUCCIÓN	2
I. ANTECEDENTES	4
I.I. ANATOMÍA DEL APARATO REPRODUCTOR DEL PERRO	5
2.1. Órganos genitales	5
2.1.1. Escroto	5
2.1.2. Testículos	5
2.1.3. Epidídimo	5
2.1.4. Conductos deferentes	6
2.1.5. Cordón espermático	6
2.1.6. Canal inguinal	6
2.2. Glándulas genitales accesorias	7
2.2.1. Glándulas vesiculares	7
2.2.2. Próstata	7
2.2.3. Glándulas bulbo uretrales	7
2.3. Genitales externos	7
2.3.1. Pene	7
2.3.2. Prepucio	8
2.3.3. Uretra masculina	8
III. ENDOCRINOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN	9
3.1. Hormonas Hipotalámicas	9
3.1.1. Hormona liberadora de gonadotropina (GnRH)	9
3.2. Hormonas Hipofisiarias	9
3.2.1. Hormona Folículo Estimulante (FSH)	9
3.2.2. Hormona Luteinizante (LH)	10
3.2.3. Prolactina	10
3.3. Hormonas foliculares	11
3.3.1. Estrógenos	11
3.3.2. Progesterona	11
3.3.3. Prostaglandinas	12
3.3.4. Andrógenos	12
3.3.5. Inhibina	12
	13

IV. FISIOLÓGÍA DE LA REPRODUCCIÓN	
4.1. Fisiología de la Reproducción del Macho	13
4.1.1. Espermatogénesis	14
4.1.2. Control de la temperatura	14
4.1.3. Transporte del semen	15
4.1.4. Erección	15
4.1.5. Eyaculación	16
V. EVALUACIÓN DE LOS REPRODUCTORES	17
5.1. Evaluación del macho reproductor	18
VI. COLECCIÓN DE SEMEN	18
6.1. Equipo Necesario para Realizar la Colección de Semen Canino	20
6.2. Manejo del Semen Canino para la Inseminación Artificial	21
6.3. Evaluación del Semen Canino	22
6.3.1. Evaluación Macroscópica del semen canino	24
6.3.1.1. Volumen	24
6.3.1.2. Color	24
6.3.1.3. Olor	25
6.3.1.4. pH	25
6.3.2. Evaluación Microscópica del semen canino	25
6.3.2.1. Evaluación de la motilidad espermática	26
6.3.2.2. Concentración espermática	27
6.3.2.3. Cuenta espermática total	27
6.3.2.4. Relación de espermatozoides vivos y muertos	27
6.3.2.5. Análisis morfológico de las células espermáticas	27
6.3.2.6. Otras células	30
6.3.3. Cultivo del semen	30
VII. OBJETIVOS	31
VIII. Justificación	31
IX. MATERIAL Y MÉTODOS	32
X. RESULTADOS	34
XI. Conclusión	35
XII. LITERATURA CITADA	36

RESUMEN

Este trabajo experimental pretendía valorar la calidad *in Vitro* del semen canino fresco, así como evaluar la variación individual en la calidad seminal de 5 perros de las razas Cobrador de Labrador. Se colectaron un total de cinco eyaculados de cada perro; Posteriormente, se procedió a evaluar la calidad seminal (motilidad, porcentaje de espermatozoides vivos, porcentaje de células con morfoanomalías) después de la colección; se observó que la motilidad, la vitalidad espermática y el porcentaje de células con morfoanomalías no eran significativamente diferentes de las obtenidas con estudios realizados por otros autores. Por otro lado, las características microscópicas en el semen fresco fueron prácticamente similares entre machos; sin embargo, se observaron diferencias entre individuos en la calidad seminal, especialmente en la motilidad espermática.

PALABRAS CLAVE: Inseminación artificial, semen fresco, calidad *in Vitro*, calidad seminal, motilidad espermática.

INTRODUCCIÓN

El aumento del valor y las posibilidades de comercialización de los cachorros de raza pura así como el aumento de la importancia de la cría canina tanto desde el punto de vista económico, recreativo o para la obtención de perros de trabajo ha impulsado el desarrollo e implementación de las biotecnologías reproductivas en esta especie.

El porcentaje de gestaciones obtenido en perras inseminadas con semen en fresco es muy elevado, tanto si se realiza una inseminación intravaginal profunda (Farstad y Andersen Berg, 1989; Forsberg, 1989) como si se utiliza una técnica de inseminación intrauterina (Silva y Verstegen, 1995; Silva y col., 1996). La prueba definitiva para evaluar la fertilidad del semen canino mediante cualquier protocolo es comparar el porcentaje de gestaciones que se obtiene tras la inseminación artificial (Rota y col., 1995). Sin embargo, es difícil llevar a cabo una comprobación experimental, ya que es necesario el uso de un gran número de animales para obtener conclusiones definitivas. En muchos estudios realizados *in vitro*, la calidad seminal del semen se valora mediante la determinación de diferentes parámetros seminales como la motilidad, la integridad de la membrana plasmática, las acrosomías y las morfoanomalías (Thomas y col., 1993; Ivanova y col., 1997; Peña y Linde-Forsberg, 2000a, b; Peña y col., 2003; Álamo y col., 2005).

La Inseminación Artificial (IA) ha beneficiado el mejoramiento genético en los perros de raza pura. El desarrollo de IA (la primera generación de biotecnologías reproductivas), junto con la evaluación de semen ha hecho posible la distribución por el mundo de material genético a un bajo costo. (Fastard W.).

Es así que en el mundo, por aproximadamente 5 décadas, muchas camadas han nacido a partir de IA con semen fresco, refrigerado y congelado.

En la clínica reproductiva diaria las variables asociadas al manejo del semen fresco, la técnica de IA implementada y la detección del momento de mayor fertilidad; están fuertemente influenciadas por el entrenamiento del operador actuante, a la infraestructura de la clínica en la que se realiza el procedimiento y al estado de salud y nutrición de los reproductores utilizados (9, 10, 11, 12, 13). Estos hechos se relacionan tanto con las particularidades de la fisiología reproductiva de la hembra como con la especial sensibilidad del semen canino, y la falta de desarrollo en esta área. (12, 14). Es así que son necesarias investigaciones dirigidas a mejorar la habilidad para mantener la capacidad fecundante del semen en caninos y obtener así tasas de preñez y tamaños de camada satisfactorios. Para que sea posible la interacción óvulo-espermatozoide y el comienzo de una nueva vida, un número suficiente de espermatozoides fértiles debe arribar a la ampolla para encontrarse con los oocitos y que ocurra así la secuencia de eventos necesarios para la fertilización (15, 16).

I. ANTECEDENTES

Hasta hace poco tiempo, se practicaba IA exclusivamente con semen fresco, el cual no era evaluado. En muchos países de Europa así como en Estados Unidos la IA con semen fresco es una práctica rutinaria. Este método puede ser implementado con bajo costo, fácil manejo y moderada infraestructura, mejorando así las posibilidades del uso del semen de reproductores valiosos.

Este hecho es el resultado tanto de la pérdida de viabilidad espermática (población de espermatozoides muertos) como de las alteraciones funcionales instauradas en la población sobreviviente (28).

La prueba definitiva para evaluar la fertilidad del semen canino mediante cualquier protocolo es comparar el porcentaje de gestaciones que se obtiene tras la inseminación artificial (Rota y col., 1995). Sin embargo, es difícil llevar a cabo una comprobación experimental, ya que es necesario el uso de un gran número de animales para obtener conclusiones definitivas. En muchos estudios realizados *in vitro*, la calidad seminal del semen se valora mediante la determinación de diferentes parámetros seminales como la motilidad, la integridad de la membrana plasmática, las acrosomías y las morfoanomalías (Thomas y col., 1993; Ivanova y col., 1997; Peña y Linde-Forsberg, 2000a, b; Peña y col., 2003; Alamo y col., 2005). Diferentes autores han intentado establecer una correlación entre la fertilidad obtenida con una muestra de semen y la valoración seminal *in vitro* de los diferentes parámetros mencionados anteriormente (Rota y col., 1995). La motilidad parece ser el mejor indicador de la fertilidad seminal (Nöthling y col., 1997).

I.I. ANATOMÍA DEL APARATO REPRODUCTOR DEL PERRO

2.1. Órganos genitales.

2.1.1. Escroto

Es un saco membranoso dividido por un séptum medio en dos cavidades, ocupadas cada una por los testículos, epidídimo y parte distal del cordón espermático. Está situado entre la región inguinal y el ano (Sisson *et al.*, 1993).

Un músculo especial en la piel del escroto, el dartos, regula la proximidad de los testículos a la pared abdominal influyendo así sobre su temperatura (Allen, 1992). La red compleja de suministro de sangre también contribuye a mantener la temperatura de los testículos por debajo de la temperatura normal del cuerpo. Esto facilita el desarrollo óptimo de los espermatozoides (Cunningham, 1999; Davol, 2000).

2.1.2. Testículos

Los testículos del macho canino son relativamente pequeños, tienen forma oval o redondeada, su eje mayor es oblicuo y esta dirigido dorsal y caudalmente (Allen, 1992; Sisson *et al.*, 1993). Atraviesan el canal inguinal entre los 4 y 5 días de edad (Cunningham, 1999), y alcanzan su ubicación en el escroto en 35 días (Allen, 1992).

2.1.3. Epidídimo

El epidídimo es largo, extremadamente enrollado sobre sí mismo e íntimamente unido a lo largo de la parte dorsal de la superficie lateral del testículo (Allen, 1992; Sisson *et al.*, 1993). Es una estructura formada por cabeza, cuerpo y cola. Los espermatozoides maduran en su paso a través de él, y en el perro, este recorrido se efectúa en 14 días (Allen, 1992).

2.1.4. Conductos deferentes

Los conductos deferentes, son la continuación de la cola del epidídimo, con una ampolla estrecha en el perro y entran a la superficie cráneo dorsal de la próstata (Cunningham, 1999; Davol, 2001; Sisson *et al.*, 1993). Este conducto transporta los espermatozoides desde el epidídimo hasta la uretra, y tiene un diámetro de 1 mm aproximadamente (Allen, 1992).

2.1.5. Cordón espermático

El cordón espermático comienza en el anillo inguinal profundo, donde sus partes constituyentes se juntan, se extiende oblicua y centralmente a través del canal inguinal y pasa junto al pene para terminar en el borde de inserción del testículo.

Está formado por las siguientes estructuras:

1. Arteria testicular.
2. Venas testiculares.
3. Linfáticos que acompañan a las venas.
4. Plexo testicular de nervios autónomos.
5. Conductos deferentes, arteria y vena.
6. Haces de tejido muscular liso alrededor de los vasos.
7. Capa visceral de la túnica vaginal.

El cordón espermático y la túnica vaginal son largos y cruzan al lado del pene muy oblicuamente. El extremo más superior de la túnica está algunas veces cerrado, de modo que no existe anillo vaginal (Sisson *et al.*, 1993).

2.1.6. Canal inguinal

Los vasos espermáticos y el conducto deferente penetran en el abdomen a través de un espacio estrecho en los músculos de la pared abdominal, que se conoce como el canal inguinal (Allen, 1992)..

2.2. Glándulas genitales accesorias

2.2.1. Glándulas vesiculares

Las glándulas vesiculares no están presentes en el perro (Cunningham, 1999; Sisson *et al.*, 1993).

2.2.2. Próstata

Allen (1992), considera a la próstata como la única glándula accesoria en el perro. La próstata es relativamente grande y a menudo está alargada, especialmente en los animales viejos (Cunningham, 1999; Sisson *et al.*, 1993). Es de color amarillento y con una estructura densa. Se localiza a la altura del borde craneal del pubis o cerca de él, rodeando el cuello de la vejiga y la uretra (Sisson *et al.*, 1993). Es una estructura bilobulada en la entrada de la pelvis. La uretra atraviesa la glándula antes de llegar a la base del pene. La próstata aumenta normalmente de tamaño según avanza la edad. Esta glándula produce una secreción transparente que es expulsada al interior de la uretra; ésta secreción es conocida como fluido prostático, y constituye la primera y tercera fracción del eyaculado; tiene poder bactericida (Allen, 1992).

2.2.3. Glándulas bulbo uretrales

Las glándulas bulbouretrales no están presentes en el perro (Cunningham, 1999).

2.3. Genitales externos

2.3.1. Pene

El pene está compuesto de raíz, cuerpo y glande. En su parte caudal existen dos cuerpos cavernosos visibles, separados por un tabique medio. En su parte craneal hay un hueso, el os *penis*, que es un hueso rodeado por el glande (Allen, 1992; Sisson *et al.*, 1993). En los perros grandes alcanza una longitud de 10 cm. o más. Está considerado como una parte del cuerpo cavernoso que se ha osificado (Sisson *et al.*, 1993).

El glande es muy grande y se extiende sobre toda la longitud del pene; su parte craneal, llamada *pars longa glandis*, es cilíndrica, con un extremo libre puntiagudo, constituye las tres cuartas partes distales del glande y termina en la abertura de la uretra; caudalmente existe un alargamiento redondeado, llamado bulbo del glande, que sin erección es difícil de apreciar, pero que cuando el pene se encuentra en erección consiste en un abultamiento más o menos esférico responsable de la fijación del pene en la vagina de la perra durante el apareamiento (Allen, 1992; Sisson *et al.*, 1993).

2.3.2. Prepucio

El prepucio forma una vaina completa alrededor de la parte craneal del pene (Sisson *et al.*, 1993). Cubre completamente el pene no erecto (Allen, 1992).

La capa más externa es ordinariamente integumento. Las capas internas son delgadas, de color rojizo y aglandulares. Presenta una mucosa que se continúa con la mucosa del pene en el glande peniano. En estas capas hay muchos nódulos linfáticos, que son especialmente grandes y a menudo prominentes en el fondo de la cavidad prepucial (Allen, 1992; Sisson *et al.*, 1993).

2.3.3. Uretra masculina

Este conducto tiene la misión de transportar tanto la orina como el semen al extremo del pene (Allen, 1992). La parte pelviana de la uretra es relativamente grande. Su primera porción se extiende desde la vejiga y está cubierta por la próstata (Allen, 1992; Sisson *et al.*, 1993).

III. ENDOCRINOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

3.1. Hormonas Hipotalámicas

3.1.1. Hormona liberadora de gonadotropina (GnRH)

Es producida en el hipotálamo (en la base del encéfalo) y transportada hasta la glándula pituitaria anterior (adenohipófisis) mediante un sistema especializado de vasos sanguíneos. Esta hormona determina de forma selectiva la liberación de la Hormona Folículo Estimulante (FSH) y de la Hormona Luteinizante (LH) (Allen, 1992; Ruckebusch *et al.*, 1991), éstas dos hormonas (FSH y LH) participan en el control de la reproducción en mamíferos machos y hembras (Ruckebusch *et al.*, 1991).

La hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), se libera en pulsaciones casi cada dos horas. Su liberación se aumenta por la noradrenalina y el estradiol. También influyen en la liberación de GnRH las feromonas que estimulan el bulbo olfatorio y señales luminosas que actúan en la retina. La dopamina, opiodes y endorfinas inhiben la descarga de GnRH. También el tratamiento prolongado con corticosteroides y el estrés tienen una retroalimentación negativa en la producción de GnRH por el hipotálamo. Cuando los niveles de estradiol son altos, el GnRH favorece la producción de la Hormona Luteinizante (LH) en lugar de Hormona Folículo Estimulante (FSH). En contraste, altas concentraciones de progesterona y bajas de estrógenos apoyan una producción hipotalámica de GnRH, dando así prioridad a producir FSH (Ruckebusch *et al.*, 1991).

3.2. Hormonas Hipofisarias

3.2.1. Hormona Folículo Estimulante (FSH)

Es sintetizada y liberada en la adenohipófisis por estimulación de la hormona liberadora de gonadotropinas hipotalámicas (GnRH) (Ruckebusch *et al.*, 1991). En la hembra es la responsable de estimular el desarrollo de los folículos en los ovarios (Allen, 1992; Ruckebusch *et al.*, 1991). No han sido bien determinadas las concentraciones circulantes en la perra (Allen, 1992). La

síntesis y liberación de Hormona Folículo Estimulante (FSH), está bajo la influencia de altas concentraciones sostenidas de estradiol. Por el contrario una elevación de progesterona aumenta la producción de GnRH, estimula la producción de FSH (Ruckebusch *et al.*, 1991). En el macho es responsable de la estimulación de algunos de los procesos en la espermatogénesis (Allen, 1992; Ruckebusch *et al.*, 1991).

3.2.2. Hormona Luteinizante (LH)

Es producida en la adenohipófisis por estimulación de la hormona liberadora de gonadotropinas hipotálamicas (GnRH) (Ruckebusch *et al.*, 1991). En la hembra es liberada en forma de pulsaciones cortas y la frecuencia de éstas pulsaciones aumenta 1 ó 2 semanas antes de comenzar el proestro. Las concentraciones circulantes aumentan hasta alcanzar un máximo 48 horas antes de que ocurra la ovulación, por eso se le conoce como hormona ovulatoria (Allen, 1992; Ruckebusch *et al.*, 1991). Su función es estimular la maduración, luteinización y ovulación de los folículos ováricos (Allen, 1992), y mantiene la luteinización folicular en la hembra que ovula (Ruckebusch *et al.*, 1991), por lo cual se considera luteotrófica (mantiene el funcionamiento de los cuerpos luteos) (Allen, 1992).

En el macho es la responsable de la estimulación de las células intersticiales (células de Leydig) en el testículo para producir testosterona y dihidrotestosterona, y por lo tanto se le conoce como hormona estimulante de las células intersticiales (ICSH) (Allen, 1992; Ruckebusch *et al.*, 1991).

Al inicio de la pubertad, los niveles altos de Hormona Luteinizante inducen a los testículos para producir testosterona, que llevará a la maduración de los espermatozoides (Davol, 2001).

3.2.3. Prolactina

Producida y liberada por la adenohipófisis. Actúa sobre la glándula mamaria para estimular la producción de leche. Sus concentraciones en sangre suelen aumentar de acuerdo a la disminución de las concentraciones de progesterona, aunque en algunos casos la progesterona puede estimular la liberación de

prolactina. La prolactina también es considerada luteotrófica (mantiene el funcionamiento del cuerpo lúteo) (Allen, 1992).

3.3. Hormonas foliculares

3.3.1. Estrógenos

Hormonas esteroides producidas en la perra por folículos en crecimiento. Los principales son 17α -estradiol, 17β -estradiol y estrona, algunos de los cuales pueden ser conjugados. Las concentraciones circulantes aumentan poco días antes del inicio del proestro, posteriormente se produce un aumento brusco de sus concentraciones en sangre, alcanzando su máximo 48 horas antes de la oleada de LH (Allen, 1992).

Los estrógenos determinan cambios que tienen lugar en el proestro, como pueden ser: (Allen, 1992)

- a) Flujo vaginal
- b) Engrosamiento de la mucosa vaginal
- c) Cambio en la consistencia de la mucosidad cervical
- d) Tumefacción de la vulva
- e) Producción de feromonas

3.3.2. Progesterona

Es una hormona esteroide producida por folículos maduros y por el cuerpo lúteo. Las concentraciones circulares aumentan cuando los estrógenos alcanzan su máximo, al final del proestro. La hormona es producida por las células de la granulosa en vías de luteinización en los folículos intactos (Allen, 1992).

Los valores en el plasma aumentan de forma constante a un promedio de 2 a 3 ng./ml. y se incrementan en el momento de la ovulación a más de 5 ng./ml. (5 a 8 ng./ml.), las concentraciones máximas se alcanzan unos 20 días después de finalizado el estro, se encuentre la perra en gestación o no. Posteriormente se produce un descenso gradual hasta sus valores mínimos, que son alcanzados 60 a 70 días después de la ovulación (Allen, 1992 Davol, 2000 Hutchison, 2001).

3.3.3. Prostaglandinas

En la perra la producción espontánea de prostaglandina por el útero no es responsable de la lisis de los cuerpos lúteos, tal como sucede en otras especies. Los cuerpos lúteos en la perra dejan de ser funcionales de forma gradual debido a la ausencia de un apoyo trófico (LH y/o prolactina) o porque tienen un ciclo vital limitado (Allen, 1992), de 63 días en las hembras preñadas y de 100 días en las hembras no gestantes (Esquivel, 2002)

3.3.4. Andrógenos

Son producidos por células en los testículos que forman pequeños islotes entre los túbulos seminíferos; estas son las células intersticiales o células de Leydig (Allen, 1992).

La conversión de testosterona a dihidrotestosterona inducirá el desarrollo de la glándula próstata, la uretra masculina, el pene, y el escroto (Allen, 1992; Davol, 2001). Después, los testículos descienden al escroto y completan el desarrollo del sistema reproductor masculino (Davol, 2001). Los efectos adicionales de la testosterona incluirán la inducción de otras características físicas del género así como los rasgos de conducta, incluyendo la conducta de apareamiento y marcando de territorio con orina (Allen, 1992; Davol, 2001). En los perros adultos las concentraciones de testosterona en plasma varían entre 0,5 y 5,0 ng./ml. En perros castrados, los valores son inferiores a 200 ng./ml. (Allen, 1992).

Se desconocen las funciones de éstas hormonas en la perra, pero se sabe que sus concentraciones circulantes alcanzan un máximo al mismo tiempo que la oleada de LH (Allen, 1992).

3.3.5. Inhibina

Esta es una hormona producida en los testículos por las células de Sertoli que inhibe la liberación de FSH (Allen, 1992; Davol, 2000; Ruckebusch *et al.*, 1991). No se ha demostrado su existencia en el perro (Allen, 1992)

IV. FISIOLÓGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

4.1. Fisiología de la Reproducción del Macho

El testículo es el órgano de apoyo para el sistema reproductor masculino; sin embargo hay que recordar que todas las funciones testiculares se encuentran influenciadas por el sistema neuroendocrino (Cunningham, 1999).

4.1.1. Espermatogénesis

Constituye un proceso complejo mediante el cual se producen los espermatozoides (células germinativas masculinas) en los tubos seminíferos de los testículos (Allen, 1992; Cunningham, 1999; Davol, 2001). Las células llamadas *espermatogonias*, que son las precursoras de los espermatozoides, se dividen de forma normal (mitosis) para dar origen a muchos *espermátocitos*. Los espermátocitos se dividen posteriormente mediante meiosis, por lo que el número normal de cromosomas queda reducido a la mitad (39) en las células resultantes que son llamadas espermátidas y se describen como *haploides* (con la mitad del número normal de cromosomas; las células con 78 cromosomas son llamadas *diploides*; en este número se incluyen los dos cromosomas sexuales). Las espermátidas se transforman en espermatozoides mediante un complejo reagrupamiento de los organelos; básicamente el núcleo pasa a formar la cabeza del espermatozoide, el aparato de Golgi forma el acrosoma, y las mitocondrias y centríolos intervienen en el desarrollo de la cola. La mayor parte del citoplasma queda en las *células de Sertoli* que aparecen sobre la membrana basal de los tubos seminíferos que regulan la metamorfosis de espermátida a espermatozoide (Allen, 1992; Cunningham, 1999).

La espermatogénesis comienza a los 4 meses de edad aunque los espermatozoides no aparecen en el eyaculado hasta los 10-12 meses (Allen, 1992). En el macho reproductor, la producción de semen es directamente proporcional al tamaño testicular. El semen se guarda en los compartimientos extragonadales del epidídimo y el conducto deferente (Cunningham, 1999; Davol, 2001). La cantidad de semen reservada dependerá de la frecuencia e intervalos entre eyaculaciones. Subsecuentemente la eyaculación frecuente

puede causar una reducción en el rendimiento del semen, ya que las reservas de semen se vacían según informes recibidos practicando una eyaculación por día, durante 5 a 7 días. Por consiguiente, una vez que se vacían reservas, el número de espermatozoides total sólo será representado por la producción diaria de semen por los testículos. Por ésta razón la recolección de semen se realiza cada dos días, para permitir que vuelva a tener reservas de espermatozoides (Davol, 2001).

Existen pocas pruebas a favor de que el eyaculado de un perro que realiza cubriciones de forma infrecuente contendrá un número elevado de espermatozoides anormales (Allen, 1992). Por el contrario, los machos con alta demanda pueden experimentar fertilidad menos óptima en ciertos momentos a lo largo de sus años reproductores. La calidad del semen, por consiguiente, es afectada a menudo por factores como la edad, el grado de excitación, frecuencia de eyaculación, técnica de la colección y manejo de la muestra (Davol, 2001).

El ciclo de la espermatogénesis, es decir, desde la división del espermatogonio hasta la aparición del espermatozoide en el eyaculado, tarda 8 semanas; durante 2 de éstas semanas los espermatozoides maduran en el epidídimo (Allen, 1992).

4.1.2. Control de la temperatura

La espermatogénesis no puede producirse con la temperatura normal del organismo en la mayoría de los mamíferos. Los mecanismos que mantienen los testículos del perro más fríos que el resto del organismo según Allen (1992), Cunningham (1999) y Davol (2001) son:

- a) Los testículos se alojan fuera de la cavidad corporal en el saco escrotal.
- b) El músculo cremáster puede influir sobre la distancia que media entre el cuerpo y el testículo.
- c) El músculo dartos en la pared escrotal puede influir sobre el tamaño del escroto y, en consecuencia, sobre la posición de los testículos.

- d) La disposición de los vasos sanguíneos en el cordón espermático permite la refrigeración de la sangre arterial mediante el retomo sanguíneo en el plexo pampiniforme.

4.1.3. Transporte del semen

Los espermatozoides llegan inmaduros a la cabeza del epidídimo; presentan una gota de citoplasma residual en el cuello. Las células maduran durante su paso a lo largo del epidídimo que se debe posiblemente a la producción constante de más semen en el testículo. Al entrar en el conducto deferente la gota (perla) se mueve hacia el extremo distal de la pieza media o es expulsada del espermatozoide, que ahora se considera maduro (Allen, 1992). Una vez maduros, los espermatozoides emigran de los testículos al epidídimo donde se almacenan. Un extremo del epidídimo se adelgaza en el conducto deferente, el tubo a través del cual el espermatozoide maduro pasa para dejar el escroto (Davol, 2001).

4.1.4. Erección

La erección es un acontecimiento psicosomático en el que intervienen los sistemas vascular, neurológico y endocrino (Cunningham, 1999). Consiste en la tumescencia del pene como resultado de una acumulación de sangre en sus tejidos provocada por la constricción del retorno venoso (Allen, 1992; Cunningham, 1999). Los factores que estimulan la erección en la mayoría de los animales son el olor de una hembra en celo (estro) y la asociación entre rutina y coito, las vías mediante las que tales estímulos inician la erección son probablemente nerviosos, aunque no se conocen completamente (Allen, 1992).

Lo primero que aparece es un engrosamiento del bulbo del glande. Entonces el collar del glande se engruesa parcialmente. Este engrosamiento se propaga a todos los espacios cavernosos. Cuando el pene está completamente erecto, el epitelio está muy tenso y las venas superficiales son prominentes (Sisson *et al.*, 1993).

En los perros solamente se produce una ligera erección antes del coito; la penetración se ve favorecida por la rigidez del hueso peniano y la erección total se produce una vez que el pene ha sido introducido en la vagina de la

perra (Allen, 1992), el bulbo del glande se alarga tanto que no puede ser retirado de la vagina (Allen, 1992; Sisson *et al.*, 1993); por tanto, el macho y la hembra quedan enlazados juntos durante 5 ó hasta 60 minutos (Sisson *et al.*, 1993). Sólo después de disminuir la erección puede separarse el macho de la hembra (Allen, 1992). La erección disminuye porque después de la eyaculación se produce un aumento en el tono del músculo liso mediado por el nervio simpático a nivel sacro, aumentando la salida de sangre de los espacios cavernosos, además de producir una contracción del músculo retractor del pene que retira el pene hacia el interior del prepucio (Cunningham, 1999), en el perro la detumescencia del bulbo, ocurre antes que en la corona y en el collar del pene (Sisson *et al.*, 1993).

4.1.5. Eyaculación

Las contracciones del músculo uretral impulsan los fluidos procedentes de los conductos deferentes y de la próstata hacia la uretra (Allen, 1992), es decir durante la eyaculación, el espermatozoide se arrastrará del epidídimo a través del conducto deferente y se combinará con líquido seminal, secretado por la glándula de la próstata, en la uretra de la próstata antes de expelerse (Davol, 2001).

El perro eyaculará el semen en tres fragmentos (Allen, 1992; Davol, 2001).

- *Primera fracción:*

La primera fracción del eyaculado es la fracción preespermática que es un volumen pequeño de fluido claro (Davol, 2001) que se elimina durante la excitación sexual inicial. Su volumen es variable aunque generalmente es de unos 0,5 ml. Puede ser eyaculada mientras el perro está empujando al intentar introducir su pene en la vagina de la perra, o puede ser expulsada tras la penetración. Procede de la próstata y su función puede ser la de lavar la vagina de restos de orina (Allen, 1992).

- *Segunda fracción*

La segunda fracción es eyaculada generalmente después de la penetración, cuando el macho deja de empujar (Allen, 1992), sin embargo hay quien afirma que durante la eyaculación de este segundo fragmento, el perro empujará vigorosamente (Davol, 2001). Esta porción del eyaculado es rica

en espermatozoides y su volumen suele ser de 0,5 a 1 ml. (Allen, 1992; Davol, 2001). Procede de los conductos deferentes y es depositada en la mitad anterior de la vagina al completarse la erección del pene (Allen, 1992). Durante y poco después de la eyaculación de esta fracción, el perro desea instintivamente girar, e incluso intentará caminar encima del brazo de la persona que realiza la recolección si se está realizando la recolección de semen por medio de una vagina artificial (Allen, 1992; Davol, 2001).

- *Tercera fracción:*

La tercera fracción procede de la próstata, suele ser expulsada mientras los perros permanecen en pie, grupa con grupa y unidos (Allen, 1992; Davol, 2001). Su volumen puede ser de 15 a 20 ml. en razas grandes y depende probablemente del tiempo que permanecen unidos. La función de la tercera fracción del eyaculado consiste probablemente en arrastrar a la segunda fracción, rica en espermatozoides, desde la vagina craneal hacia el útero de la perra (Allen, 1992), sin embargo, no siempre es favorable el efecto de la tercera fracción sobre los espermatozoides ya que se trata de fluido prostático (Daval, 2001). Al final de la eyaculación se produce la desinflamación del pene y su retirada de la vagina (Allen, 1992).

V. EVALUACIÓN DE LOS REPRODUCTORES

El éxito de la reproducción en caninos está íntimamente relacionado con:

- 1) Estado de salud y nutrición de los reproductores.
- 2) Detección del momento de mayor fertilidad de la hembra.
- 3) Tipo, manejo y calidad del semen utilizado.
- 4) Implementación de una técnica adecuada de IA.

Si se cumplen con estos requisitos, la probabilidad de éxito será alta mientras que, en caso contrario, será una experiencia frustrante (Stornelli *et al.*, 2001). Usada correctamente, la evaluación del semen es una herramienta útil para mejorar la calidad global de todas las razas caninas. Si se utiliza para

eliminar características indeseables genéticamente o para potencializar las deseables (Foster y Smith, 2001)

5.1. Evaluación del macho reproductor

La elección de un macho reproductor depende de:

- Su habilidad física de copular.
- Su conducta para copular (es decir su lívido).
- La producción de una muestra normal de semen (Davol, 2001).

Si cualquiera de estos factores falla, entonces disminuye la probabilidad de que la perra con la que se realice la cruce o la Inseminación Artificial (IA), resulte gestante. Desde el punto de vista físico, la nutrición apropiada y el ejercicio, son esenciales para asegurar la fertilidad en el macho. A los machos que son utilizados para la reproducción se les debe practicar un examen físico completo para su evaluación; ortopédica, neurológica, endocrinológica, y del sistema genital antes de llevar a cabo el cruzamiento ó la Inseminación Artificial (Davol, 2001).

Con respecto a la calidad de semen, la fertilidad no necesariamente depende de la edad del perro, parece ser más dependiente de la fase del semen dentro del eyaculado (semen inmaduro o viejo) o cambios morfológicos que ocurren en los espermatozoides (Davol, 2001). Es fácil estudiar al macho debido a que la producción de espermatozoides es constante, y no depende de un ciclo reproductivo (Esquivel, 2002).

VI. COLECCIÓN DE SEMEN

Para la recolección del semen, es imprescindible que el macho se encuentre en un lugar tranquilo, de ser posible conocido por él, en donde no se muestre nervioso ni distraído (Villalba, 1997). Los suelos resbalosos y las personas que visten de blanco pueden desanimar al perro (Allen, 1992).

La recolección de semen de un perro es muy sencilla. Una hembra en calor (teaser) se trae junto al macho, y cuando él intenta montarla, su pene se remite en una vagina artificial y se estimula para causar una eyaculación (Villalba, 1997; Davol, 2001; Foster y Smith, 2001). Generalmente se sujeta el pene con la mano derecha del operador, situado en el lado izquierdo del perro (Allen, 1992). Se comienza proporcionando estímulo manual al pene (haciendo masaje rápido a través del prepucio). Una vez que la erección ocurre, el prepucio se retrae hasta el punto que la persona que realiza la recolección pueda poner el cono colector o vagina artificial en el pene erecto, y entonces debe sostener herméticamente el pene y el cono colectivo, y se le aplican contracciones rítmicas simulando el encogimiento vulvar de la perra que ocurre durante la cópula (Allen, 1992; Davol, 2001).

Si el bulbo del glande está demasiado inflamado y no es posible sacar el glande del prepucio; el perro será separado de la hembra hasta que haya remitido la erección, o puede intentarse recoger el semen con el glande en el interior del prepucio pero este proceder puede resultar incómodo para el perro (Allen, 1992).

La presencia de la hembra es útil para excitar al macho y hacer la colección más fácil, ya que durante el estro, se excretan compuestos orgánicos conocidos como feromonas en la vagina de la hembra y éstos químicos son responsables de atraer a los machos aún a distancias largas (Purswell y Parker, 2000; Foster y Smith, 2001). Sin embargo, tales hembras no siempre están disponibles cuando se realiza la recolección de semen a un macho. Cuando esto sucede, una práctica común es preservar hisopos de algodón congelados que fueron humedecidos en la vagina de una hembra cuando estaba celo. En el momento de la recolección del semen, los hisopos pueden pasarse alrededor del área de la cola de cualquier perra o perro (incluso uno castrado). El macho responderá entonces a ella como si estuviera en calor (Foster y Smith, 2001). Un error en la recolección del semen puede desquiciar al perro y provocar un trauma psicológico (Allen, 1992).

6.1. Equipo Necesario para Realizar la Colección de Semen Canino

Los equipos de colección deben ser estériles o se deben desinfectar antes de usar. Es importante saber que ciertos factores externos como temperaturas extremas, exposición a los lubricantes y químicos encontrados en látex y recipientes de plástico usados para la recolección de semen pueden afectar adversamente a los espermatozoides (Davol, 2001).

Generalmente el equipo para realizar la recolección de semen consiste en un cono de látex adherido a un tubo centrífugo de plástico (Davol, 2001), pero éste método no resulta ideal porque dificulta la recogida de las fracciones por separado y porque el látex puede ser tóxico para los espermatozoides (Allen, 1992).

Por otro lado el uso de la vagina artificial que consiste básicamente en un tubo cilíndrico lleno de agua caliente; resulta un procedimiento totalmente inadecuado porque:

- Es innecesario.
- Su empleo es complicado e incómodo.
- Permite un contacto prolongado entre el semen y la cubierta de látex que puede originar la inmovilidad total de los espermatozoides (Allen, 1992).

En base a lo anterior Allen (1992), recomienda el uso de uno o dos embudos de cristal o de plástico, para facilitar la recolección del semen teniendo la ventaja de poder recolectar por separado las fracciones del eyaculado. El plástico no se rompe, pero debido a que es ligero no se puede detener con firmeza y puede ser desalojado de la mano de la persona que realiza la recolección, por una patada del perro o por un movimiento de la cola (Allen, 1992).

En perros muy agresivos o en los que no logran eyacular por la técnica manual, puede utilizarse electro eyaculación, con sedación previa del paciente (Stornelli *et al.*, 2001).

Cuando la colección está completa, el perro debe ser supervisado para asegurar que el pene tiene una regresión normal y retorna a su posición natural dentro del prepucio (Davol, 2001).

Antes de planificar una Inseminación Artificial o la recolección del semen para su preparación, se obtendrá una muestra de semen del perro para determinar su calidad y familiarizar al animal con el procedimiento (Allen, 1992).

6.2. Manejo del Semen Canino para la Inseminación Artificial

El perro eyaculará el semen en tres fragmentos. El primer fragmento es la fracción preespermática que es un volumen pequeño de fluido claro. El segundo fragmento es un fragmento nublado, rico en espermatozoides. Antes de eyacular el tercer fragmento que consiste en fluido prostático claro, el perro normalmente desmontará e intentará caminar encima del brazo de la persona que realiza la recolección (Allen, 1992; Davol, 2001).

Durante los movimientos violentos de empuje no es momento para la recolección del eyaculado porque será la primera fracción carente de espermatozoides (Allen, 1992), por otro lado, Davol (2001) afirma que es durante los movimientos de empuje vigoroso cuando se está eyaculando la segunda fracción (rica en espermatozoides) (Davol, 2001). La segunda fracción se eyacula mediante 4-10 contracciones uretrales. Si es posible se recogerá por separado en el segundo tubo de ensayo, pero si es muy concentrada y de pequeño volumen, pueden ser necesarios varios mililitros de la tercera fracción para arrastrarla del embudo de recogida al tubo de ensayo (Allen, 1992).

Si el semen recolectado va a ser guardado, en lugar de ser usado para la inseminación inmediata, es importante que la persona que realiza la recolección quite el tubo que contiene los primeros dos fragmentos antes de la eyaculación del fluido prostático (Davol, 2001). Ya que agregar el fluido prostático durante el procesamiento de congelación del semen canino afecta adversamente la motilidad y viabilidad de los espermatozoides, sin embargo, el fluido prostático no parece afectar la motilidad y viabilidad de espermatozoides

refrigerados. El fluido prostático, en cualquier sistema de preservación, no afecta la integridad del acrosoma de los espermatozoides (Sirivaidyapong *et al.*, 2001). Resulta sorprendente que los espermatozoides incubados *in vitro* en fluido prostático sean menos viables que los incubados en diluyentes comerciales para semen canino (Davol, 2001).

Pero si la inseminación será realizada inmediatamente, el fluido prostático puede recolectarse con los primeros dos fragmentos para rendir un volumen de semen total que sea suficiente para la inseminación (Davol, 2001).

El semen debe manejarse como material biológico potencialmente peligroso, como todo los fluidos del cuerpo. Ya que existen muchos organismos bacterianos que infectan a los perros y pueden ser transmitidos a los humanos durante la recolección del semen. Por lo tanto, el semen representa un riesgo potencial para la salud. Es esencial que la persona que realiza la recolección y el evaluador del semen, practiquen las precauciones básicas para reducir riesgos de infección. (utilizando equipo protector como guantes y anteojos, lavarse las manos, desinfección apropiada del equipo o el manejo de todo el equipo contaminado como material biológico peligroso) (Davol, 2001).

6.3. Evaluación del Semen Canino

El conocimiento de la calidad de semen de un macho destinado a la reproducción nos permitirá estimar las probabilidades de éxito en la utilización del mismo para realizar Inseminación Artificial (IA) con semen fresco o criopreservado (Stornelli *et al.*, 2001). Por medio de la evaluación del semen también podemos confirmar que la espermatogénesis en un perro joven es normal, antes de comenzar a usarlo como semental. También se puede comprobar la producción de semen en un macho que ha padecido alguna enfermedad reproductiva o después haber sometido al semental a una terapia con fármacos (Allen, 1992).

Las células espermáticas se verifican para asegurar que tengan una concentración suficiente, motilidad adecuada, y que son anatómicamente normales. Esto se hace porque sabemos que en muchos machos "estériles", el

problema no es la producción células espermáticas, sino que los espermatozoides pueden tener anomalías, y son incapaces de viajar a través de los oviductos de la hembra, o no pueden penetrar el óvulo para que ocurra la fertilización (Foster y Smith, 2001). En el perro la información disponible sobre la relación entre calidad del semen y fertilidad es escasa comparada con otras especies (Stornelli *et al.*, 2001).

Davol (2001) recomienda para la evaluación de semen, que la colección se divida en dos partes:

1. El preesperma y fragmento rico en espermatozoides.
2. El fragmento del fluido prostático (Davol, 2001).

Por otra parte deben examinarse los sedimentos de los fragmentos para descartar la presencia de las células sanguíneas, células inflamatorias, células epiteliales o bacterias que pueden ocasionar desórdenes en el sistema reproductor masculino (Davol, 2001). Para evaluar el semen eficazmente se debe utilizar el fragmento espermático con la mínima contaminación de fluido prostático (Fayrer, 1996). Sin embargo, para la valoración completa de la función reproductora masculina, es aconsejable coleccionar el fluido prostático separadamente con el propósito de realizar un cultivo (Davol, 2001).

Para realizar una Inseminación Artificial (IA) deben utilizarse sólo muestras evaluadas como normales (Davol, 2001). Ya que el semen de baja calidad se relaciona no sólo con bajos porcentajes de preñez, sino también con la baja producción de cachorros (Stornelli *et al.*, 2001).

Con la evaluación del semen no puede asegurarse que un perro es fértil o no lo es, porque la fertilidad incluye la capacidad de montar y copular con normalidad, lo que puede determinar si es fértil o no lo es, es el número de cachorros que ha producido ese semental y con cuantas hembras. Es decir, los perros que producen semen de baja calidad (escasa motilidad, número reducido, muchos espermatozoides anormales) son fértiles si los apareamientos son repetidos en las proximidades del momento de ovulación de la perra, esto puede aumentar la probabilidad de que quede gestante, aunque debe esperarse que muchas ocasiones no haya éxito (Allen, 1992).

Ninguna característica por sí sola es una medida precisa de fertilidad, para que un macho se considere bueno como semental (Birchard y Sherding, 1996).

6.3.1. Evaluación Macroscópica del semen canino

El semen debe colectarse bajo las condiciones óptimas y debe protegerse, de cambios como la temperatura y la luz (Fayrer, 1996). Esta evaluación se realiza inmediatamente después de la recolección e incluye volumen, color, olor y pH (Allen, 1992; Fayrer, 1996). Cualquier agente (orina, pus, sangre) que contamine el semen afecta la concentración, motilidad y la vida de los espermatozoides (Birchard y Sherding, 1996).

6.3.1.1. Volumen

No está relacionado con la fertilidad (Corona, 2001), pero es necesario registrar el volumen de la porción espermática para poder calcular el número total de espermatozoides por eyaculado. Se mide en un tubo de ensayo graduado, o comparando dicho tubo con el tubo de la muestra, la consistencia de la muestra será una buena orientación para decidir si contiene un número suficiente de espermatozoides (Allen, 1992). La fracción espermática puede medir desde 0.5 ml. (Allen, 1992), pudiendo llegar a 6 ml., pero esto varía de acuerdo a la edad, tamaño del perro, frecuencia de colectas, cantidad colectada de líquido prostático, época del año, etc. (Corona, 2001).

6.3.1.2. Color

El color normal del semen va desde un color blanco a blanco opaco (Fayrer, 1996; Birchard y Sherding, 1996), aunque dependerá de la concentración espermática (Corona, 2001). En caso de infección del aparato reproductor, el semen presenta una coloración verdosa (Fayrer, 1996; Birchard y Sherding, 1996; Corona, 2001), o verde amarillento que denota la presencia de neutrófilos (Fayrer, 1996). Un color café denota una prostatitis (Fayrer, 1996),

y un color amarillo indica contaminación con orina (Fayrer, 1996; Corona, 2001), que es espermicida (Fayrer, 1996).

6.3.1.3. Olor

El olor normal del semen es característico, ligeramente aromático (sosa o cloro); su modificación es considerada patológica, y por lo general es debido a contaminaciones (Corona, 2001).

6.3.1.4. pH

El pH normal se encuentra en un rango de 6.3 a 7, dependerá de la cantidad de líquido prostático de la tercera fracción, además de evaluarse con tira reactiva, que es un método muy subjetivo (Corona, 2001).

6.3.2. Evaluación Microscópica del semen canino

El examen microscópico del semen debe realizarse inmediatamente después de recolectarlo (Birchard y Sherding, 1996).

La evaluación microscópica del semen normalmente considera: (Morton, 1986)

- Evaluación de la motilidad espermática.
- Concentración espermática.
- Cuenta espermática total.
- Relación de espermatozoides vivos y muertos.
- Análisis morfológico de las células espermáticas.
- Otras células.
- Cultivo de semen.

6.3.2.1. Evaluación de la motilidad espermática

La motilidad es una variable de gran importancia en la calidad seminal. Se estima que un semen de buena calidad debe poseer no menos del 70 % de espermatozoides con motilidad progresiva. En el semen congelado la motilidad

espermática luego del descongelado es el mejor indicador de fertilidad (Esquivel, 2002; Stornelli *et al.*, 2001).

La motilidad espermática se valora colocando una gota de semen sobre un portaobjetos caliente, se coloca encima un cubreobjetos, y se observa al microscopio con objetivo de 40 aumentos (Allen, 1992; Fayrer, 1996). Se calcula el porcentaje de los espermatozoides que nadan activamente, en líneas relativamente rectas, a través del campo de visión. La motilidad descenderá según pase el tiempo de permanencia del portaobjetos sobre la platina del microscopio (probablemente debido al efecto de la luz y del enfriamiento). La motilidad de las células espermáticas puede ser afectada por la temperatura y por sustancias tóxicas presentes en el equipo utilizado para la recolección de la muestra (Allen, 1992).

6.3.2.2. Concentración espermática

Suele determinarse mediante la dilución de la muestra con el 20% de agua, es decir, para obtener una dilución 5:1 (semen: agua), por ejemplo, 20 ml. de eyaculado mezclados con 4 ml. de agua, esto matará a los espermatozoides del perro de forma que pueden ser contados. Se coloca un cubreobjetos sobre una cámara de recuento de Neubauer y la muestra diluida es introducida al igual que se realiza para el recuento de células sanguíneas (Allen, 1992).

En el microscopio con objetivo de 40 aumentos (seco fuerte), se cuenta el número de espermatozoides en cinco cuadrados grandes; se obtiene el promedio de cuatro recuentos (horizontal, vertical o diagonalmente), al número promedio de espermatozoides en cinco cuadrados se le agregan 0000 y ésta será la concentración de espermatozoides por mm^3 (Allen, 1992).

Corona (2001), menciona un número de 200 a 1000 millones de espermatozoides por ml. Pero se piensa que la fertilidad normal es posible cuando la cuenta espermática es mayor de 200 millones de espermatozoides normales vivos en el eyaculado (Birchard y Sherding, 1996), por el contrario las cuentas menores de 100 millones han sido asociadas con infertilidad (Fayrer, 1996).

6.3.2.3. Cuenta espermática total

Es necesario registrar el volumen de la porción espermática para poder calcular el número total de espermatozoides por eyaculado. Éste se mide en un tubo de ensayo graduado, la consistencia de la muestra será una buena orientación para decidir si contiene un número suficiente de espermatozoides (Allen, 1992).

La cuenta de espermatozoides totales en un macho sexualmente descansado abarcan reservas de semen, más el semen diario producido por los testículos. Las reservas de semen se vacían según informes recibidos una vez por eyaculación por día durante 5 a 7 días. Por consiguiente, una vez que se vacían las reservas, el número de semen total sólo será representado por la producción diaria de semen por los testículos (Davol, 2001); por lo tanto la calidad del semen canino no se ve influenciada por el momento de su eyaculación anterior, siempre que el perro no haya eyaculado ya en ese mismo día; sin embargo, si un perro intranquilo proporciona una muestra de baja calidad, hay que repetir el examen (Allen, 1992).

Las lesiones en los tubos seminíferos a consecuencia de enfermedad escrotal o testicular, reducen la cuenta espermática (Birchard y Sherding, 1996).

6.3.2.4. Relación de espermatozoides vivos y muertos

El porcentaje vivo de la población celular espermática puede determinarse por medio de la observación del semen en un microscopio con el objetivo de 40 aumentos. Se cuentan 10 células espermáticas y se determina el número de células vivas. Éste procedimiento se realiza de 4 a 5 veces, y se estima un promedio. Este valor es importante considerarlo para determinar la dosis de inseminación para una perra (Fayrer, 1996).

6.3.2.5. Análisis morfológico de las células espermáticas

El significado de las alteraciones morfológicas de los espermatozoides es un parámetro muy poco estudiado (Stornelli *et al.*, 2001). El semen debe ser

valorado mediante el estudio del mismo al microscopio, que nos permitirá conocer si hay o no anomalías morfológicas (Villalba, 1997). Sin embargo, la evaluación microscópica de semen no es ninguna garantía de que el semen sea capaz de fertilizar, ya que puede haber fallas a nivel molecular del ADN en los espermatozoides que provoquen la esterilidad (Foster y Smith, 2001). Con la evaluación microscópica la subjetividad del análisis hace difícil cualquier comparación de resultados (Iguer-ouada y Verstegen, 2001a).

Según Allen (1992), los perros que no producen espermatozoides, o que tienen una mala calidad de semen pueden:

- Haber sido tratados con esteroides anabólicos o con otros andrógenos; su efecto suele ser reversible y el eyaculado volverá a ser normal en 2 meses.
- No haber eyaculado bien, generalmente por nerviosismo.
- Haber padecido una parada espermatogénica; estos perros son inicialmente fértiles aunque padecen una degeneración testicular rápida y asintomática que provoca aspermia permanente. (Allen, 1992).

El procedimiento para realizar el análisis morfológico de las células espermáticas consiste en (Allen, 1992; Fayrer, 1996):

- Una combinación de colorantes
 1. Nigrosina
 2. Eosina
- Se colocan varias gotas del colorante nigrosina/eosina en un tubo de ensayo y se calientan en un baño maría durante 2 minutos.
- Añadir una gota de semen.
- Con una pipeta, se coloca una gota de la mezcla colorante/semen sobre un portaobjetos.
- Se realiza una extensión fina, al igual que se hace en la preparación de una extensión para hematología.
- Dejar secar la extensión.

- Examinar el portaobjetos en el microscopio con objetivo de 100 aumentos usando aceite de inmersión.

En la extensión se aprecian las siluetas de los espermatozoides, sobre un fondo negro por la nigrosina (Allen, 1992).

La morfología de la célula espermática se subdivide en tres grupos (Allen, 1992; Fayrer, 1996; Corona, 2001):

- Células normales.
- Células anormales primarias.
- Células anormales secundarias.

Basándose en Allen (1992) y Corona (2001), puede hacerse la siguiente clasificación morfológica de las anomalías de la célula espermática:

a) *Anormalidades primarias:*

- Doble flagelo.
- Cola doblada.
- Microcéfalo.
- Macrocéfalo.
- Cabeza alargada.
- Cabeza doble.
- Cabeza periforme

b) *Anormalidades secundarias:*

- Cabeza y cola sueltas.
- Anomalías de la cabeza:
 - Desprendimiento o separación prematura del acrosoma.
 - Acrosomas protuberantes.
 - Defecto de cráter.
- Anomalías del cuello:
 - Cuello torcido.
 - Cuello roto.

- Gota citoplasmática intermedia.
- Anomalías en la pieza media:
- Gota citoplasmática distal.
- Unión al cuello.
- Anomalías en la cola:
- Cola torcida.
- Cola enrollada.

Se ha observado que la presencia de gota citoplasmática proximal tiene relación con la pérdida de la capacidad fecundante del espermatozoide. Por el contrario, la presencia de gota citoplasmática distal no se ha relacionado con pérdida de fertilidad seminal. Ambos defectos disminuyen la resistencia espermática al congelado. Algunos autores han comunicado, que los defectos espermáticos primarios y secundarios no deben exceder el 30 o 40 % de la muestra (Stornelli *et al.*, 2001).

6.3.2.6. Otras células

Pueden verse células pequeñas redondas (eritrocitos o neutrófilos). Los eritrocitos se observan en los eyaculados de perros con edades superiores a los 5 años y tienen origen indudablemente en la glándula próstata, y suelen aparecer sin que exista enfermedad clínica (Allen, 1992).

6.3.3. Cultivo del semen

Un cultivo de semen para identificar bacterias es a menudo difícil de interpretar debido a los numerosos microorganismos que normalmente habitan en la uretra y el prepucio. Sin embargo, cuando el número de bacterias en la muestra es muy elevado pueden indicar infección (Daval, 2001). El cultivo de la fracción rica en espermatozoides identifica a los microorganismos que se originan en testículos y próstata (Birchard y Sherding, 1996) y preferentemente debe estar libre de fluido prostático (Fayrer, 1996).

Además, los cultivos de fluido prostático pueden ser útiles para identificar organismos asociados con prostatitis o disfunción prostática (Daval, 2001; Birchard y Sherding, 1996).

VII.- OBJETIVOS

1. Evaluación macroscópica del semen fresco en caninos de la raza cobrador de labrador.
2. Evaluación microscópica del semen fresco en caninos de la raza cobrador de labrador.
3. Determinar la calidad del semen evaluado.

VIII. Justificación

Es importante destacar que el proceso de evaluación de semen canino es de mediano a un alto costo, pudiendo implementarse con equipamiento y moderado entrenamiento del operador. En nuestro país permitirá a los Médicos Veterinarios de práctica privada brindar un nuevo servicio, aumentar sus ingresos y mejorar su práctica diaria.

Procesos adecuados de evaluación determinarán un porcentaje de células espermáticas dañadas. Lo cual forma parte de los factores que permiten altos porcentajes de preñez y un mayor tamaño de camada.

Con el desarrollo de la evaluación de semen junto con la determinación exacta del momento de mayor fertilidad de la hembra y una adecuada técnica de IA, esta biotecnología brindará grandes posibilidades en el futuro. (Stornelli *et al.*, 2001).

IX. MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio en la Ciudad de Torreón, Coahuila. Los animales utilizados pertenecían a diferentes propietarios, que nos cedían periódicamente sus perros para la obtención del semen. Se utilizaron 5 ejemplares de la raza Cobrador de Labrador; con edades entre 2-4 años y un peso medio de 28 kg. Un mes antes de comenzar el estudio, los perros fueron entrenados para la obtención de semen mediante estimulación manual.

Material requerido para el estudio.

- a. Portaobjetos
- b. Cubreobjetos
- c. Microscopio de luz visible
- d. Material para tinción
- e. Gasas
- f. Jeringas (1,3,5,10 ml)
- g. Guantes exploración y estériles (látex)
- h. Agua destilada
- i. Cámara (newbauer)
- j. Agitador
- k. Bozal
- l. Tela adhesiva
- m. Material para la colección del semen

Material biológico

Los animales experimentados fueron proporcionados por diferentes propietarios de la ciudad de Torreón, Coahuila.

Se colectaron 10 muestras de semen fresco canino mediante estimulación manual. De cada eyaculado se recolectaron las tres fracciones. Los donantes fueron 5 perros de la raza Cobrador de Labrador sexualmente maduros y con antecedentes de ser buenos reproductores; con una edad promedio de 3 ± 1 años y un peso promedio de 35 ± 5 kg.

Recogida y evaluación seminal.

El semen se recogía mediante estimulación manual sobre el bulbo penenano, depositando el eyaculado en un tubo de plástico graduado y atemperado (Peña y Lide-Forsberg, 2000a; Yildiz y col., 2000). Se obtenía dos

eyaculados por semana de cada perro, durante un total de cuatro semanas consecutivas. Por tanto, en esta experiencia se utilizaron cuatro eyaculados de cada uno de los cinco machos. Inmediatamente tras la recogida, la fracción espermática era analizada para determinar su volumen, concentración y motilidad, así como el porcentaje de vitalidad y de morfoanomalías. El volumen seminal se determinaba directamente en el tubo de recogida (Rota y col., 1999). Para calcular la concentración, una parte proporcional de semen se diluyó (1:40) en solución salina formolada (Mickelsen y col., 1993; Rijsselaere y col., 2002). El porcentaje de motilidad se calculaba por valoración de una muestra de semen, usando un microscopio de contraste de fases, provisto de una placa calentadora (37°C), a 100 y 200 aumentos (Nöthling y col., 1997; Peña y col., 2003; Alamo y col., 2005).

El porcentaje de vitalidad y de morfoanomalías se determinó mediante una extensión de eosina-nigrosina (Nöthling y col., 1997; Hewitt y col., 2001), utilizando un microscopio de contraste de fases a 1000 aumentos; valorando un mínimo de 200 espermatozoides por eyaculado. Los espermatozoides se clasificaron en vivos y muertos (membrana dañada y teñidos); además, las morfoanomalías se contabilizaron en función de su localización (cabeza, cuello, pieza intermedia o cola).

X. RESULTADOS

La Tabla 1, muestran la calidad seminal en fresco de los donantes. Al valorar el volumen y la concentración seminal, se observaba que el macho 1 presentaba un menor volumen ($p < 0.05$) que los machos 2 y 3, y una concentración significativamente mayor ($p < 0.05$) que los machos 4 y 5. No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de motilidad y vitalidad cuando se comparaban entre sí los diferentes ejemplares; la motilidad tenía un valor alrededor del 90% (rango individual: 85-95%) mientras que la vitalidad media era superior al 94% (rango individual: 88-97%). El número de morfoanomalías era inferior al 10% en todos los perros.

Perros	Eyaculados por perro	Volumen (ml)/ eyaculado	Concentración ($\times 10^6$ células /ml)	Motilidad (%)	Viabilidad (%)	Morfoanomalías (%)
Arak	8	2.5	1300	90	95	6
Bruno	8	3	800	91	95	4
Canelo	8	3.5	1100	90	90	4
Hosh	8	2	770	90	90	3
Maclovio	8	2.5	700	90	89	5
MEDIA	8	2.61	884.08	90.20	91.72	4.17

XI. Conclusión

La clave para tener éxito en cualquier programa de la cría es la planeación. Esto es más importante cuando se trata de la evaluación de semen. Ahora que nosotros tenemos evaluado el semen y preparado un producto de buena calidad, pensamos en la perra reproductora.

En situaciones donde tenemos una cantidad muy limitada de semen. Es mejor una perra que ha sido buena reproductora en el pasado. Lo que quiero decir; es que tenga ciclos estrales normales, concibe sin dificultad, y llega al término sin complicaciones.

Todas las perras, primerizas o no, debe examinarse para *Brucella canis* y micoplasma. Estas infecciones se transmiten durante el apareamiento y el contacto casual podría transmitir estas enfermedades de un animal a otro sin reproducirse. Al mismo tiempo puede verse afectada la calidad del semen a utilizar.

XII. LITERATURA CITADA

1. Allen, E. 1992. Fertility and obstetrics in the dog. Oxford (England): Blackwell Scientific publications limited. p. 1-175.
2. Birchard, S. J. y R. G. Sherding. 1996. Manual Clínico de Pequeñas Especies. Tomo II, México: McGraw-Hill. p. 1044-45.
3. Brown, R. M. 1992. An update of artificial insemination with fresh, chilled, and frozen semen. *Probl Vet Med.* 4(3): p. 445-52.
4. Burgess, C. M., J. C. Bredl, J. M. Plummer y G. C. England. 2001. Vital and ultrastructural changes in dog spermatozoa during cryopreservation. *J Reprod Fertil Suppl.* 57: p. 357-63.
5. Corona, C. G. 2001. Evaluación del semen. Colegio de Médicos Veterinarios Zootecnistas Profesionales en Especies Menores de la Comarca Lagunera, A.C. V Congreso Anual; 2001 Mayo 3-5; Torreón, Coahuila. México. sp.
6. Cunningham, J. G. 1999. Fisiología Veterinaria. 2° ed México: McGraw-Hill. p. 561-70.
7. Davol, P. A. 2001. Canine Reproduction. Part 4. Reproduction and the Male Dog. <<http://www.labbies.com/reproduction4.htm>.> [Consulta: 10 de Agosto de 2002]
8. Davol, P. A. 2000. Canine Reproduction. Part 1: Reproduction and the Bitch. <http://www.labbies.com/canine_reproduction_table.> [Consulta: 10 de Agosto de 2002]

9. Esquivel, L. C. 2002. Reproducción en Pequeñas Especies. Memoria de la XII semana de Ciencia Animal; 2002 28 Octubre - 2 Noviembre; Torreón Coahuila. México. Formato Electrónico.
10. Farstad, W. 2000. Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology*, 53(1): p. 175-86.
11. Fayrer, H. F. 1996. Canine Theriogenology Notes (Male). IAM.
<<http://lam.vet.uga.edu/LAM/LM000030.HTML#VII.%20%20Sex%20hormone%20alopecias>> [Consulta: 20 de Mayo de 2002]
12. Fontbonne, A. y F. Badinand. 1993. Canine artificial insemination with frozen semen: comparison of intravaginal and intrauterine deposition of semen. *J Reprod Fertil Suppl*, 47: p. 325-7.
13. Foster, R. y M. Smith. 2001. Artificial Insemination (AI). *Pet Education*.
<<http://www.peteducation.com/repro/AI.htm>> [Consulta: 25 de Mayo de 2002]
14. Gunzel, A. R. 1986. Sperm collection, evaluation, preservation and artificial insemination in the dog. *Tierarztl Prax*, 14(2): p. 275-82.
15. Hutchison, R. V. 2001. Canine Reproduction for Breeders, Seminar. Company at the 2001 Westminster Kennel Club Show.
16. <<http://www.amchessieclub.org/conception.html>> [Consulta: 6 de Julio 2002]
17. Iguer-ouada, M. y J. P. Verstegen. 2001a. Evaluation of the "Hamilton Thorn computer-based automated system" for dog semen analysis. *Theriogenology*, 55(3): p. 733-49.

18. Iguer-ouada, M. y J. P. Verstegen. 2001b. Long-term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology*, 55(2): p. 671-84
19. Johnston, D. J., M. V. R. Kuztritz y P. Olson. 2001. Canine and feline theriogenology. Philadelphia (United States): Ed. Saunders. 16:287-306.
20. Linde-Forsberg, C. 1991. Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 21(3): p. 467-85.
21. Linde-Forsberg, C., H. B. Strom y G. Govette. 1999. Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen:
22. a retrospective study. *Theriogenology*, 52(1): p. 11-23.
23. Linde-Forsberg, C. y M. Forsberg. 1989. Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. *J Reprod Fertil Suppl*, 39: p. 299-310.
24. Morton, D. B. 1986. Review on the use of frozen semen in dog breeding. *Animal Technology*, 37(1): p. 67-71
25. Pena, A. y C. B. Linde-Forsberg. 2000a. Effects of spermatozoal concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. *Theriogenology*, 54(5): p. 703-18.
26. Pena, A. y C. B. Linde-Forsberg. 2000b. Effects of Equex, one- or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology*, 54(6): p. 859-75.
27. Pena, A., A. Johannisson y C. B. Linde-Forsberg. 1999. Post-thaw evaluation of dog spermatozoa using new triple fluorescent staining and flow cytometry. *Theriogenology*, 52(6): p. 965-80

28. Pérez, O. A. 2001. Historia Veterinaria: Verdades y mitos sobre lo que han hecho los Veterinarios (Conclusión).
29. <<http://www.visionveterinaria.com/historia/04dic2001.htm>> [Consulta: 25 de Agosto de 2002]
30. Pinto, C. R., D. L. Paccamonti y B. E. Eilts. 1999. Fertility in bitches artificially inseminated with extended, chilled semen. *Theriogenology*, 52(4): p. 609-16.
31. Purswell, B. J. y N. A. Parker. 2000. Modern breeding management in dogs. *Veterinary Medicine*.
32. <<http://www.hilltopanimalhospital.com/modern%20breeding%20management.htm>> [Consulta: 29 de Septiembre de 2002]
33. Rota, A., A. Frishling, I. Vannozzi, F. Camillo y S. Romagnoli. 2001. Effect of the inclusion of skimmed milk in freezing extenders on the viability of canine spermatozoa after thawing. *J Reprod Fertil Suppl*, 57: p. 377-81.
34. Ruckebusch, Y., L. P. Phaneuf y R. Dunlop. 1991. Fisiología de pequeñas y grandes especies. México, D.F.: El Manual Moderno, S.A. de C.V. p. 600-26.
35. Silva, L. D., K. Onclin, B. Lejeune y J. P. Verstegen. 1996. Comparisons of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen. *Vet Rec*, 138(7): p. 154-7.
36. Sirivaidyapong, S., P. Ursem, M.M. Bevers y B. Colenbrander. 2001. Effect of prostatic fluid on motility, viability and acrosome integrity of chilled and frozen-thawed dog spermatozoa. *J Reprod Fertil Suppl*, 57: p. 383-6.

37. Sisson, S., J. D. Grossman y R. Getty. 1993. Anatomía de los animales domésticos. 5° ed. Tomo II, México: Salvat. p. 1728-41.
38. Stornelli, M. A., M. C. Stornelli, M. S. Arauz y L. Sota. 2001. Inseminación artificial con semen fresco, refrigerado y congelado. Aplicación y desarrollo en caninos. ANALECTA VETERINARIA, 21, 1: p. 58 –66.
39. Strom, H. B., B. Larsson, C. B. Linde-Forsberg y H. Rodriguez. 2000. Evaluation of chilled and frozen-thawed canine spermatozoa using a zona pellucida binding assay. J Reprod Fertil Suppl, 119(2): p. 201-6.
40. Thomassen, R., W. Farstad, A. Krogenaes, J. A. Fougner y K. A. Berg. 2001. Artificial insemination with frozen semen in dogs: a retrospective study. J Reprod Fertil Suppl, 57: p. 341-6.
41. Villalba, G. A. 1997. La inseminación artificial. Infomascota.
42. <<http://www.infomascota.com>> [Consulta: 30 de Abril de 2002]
43. Wilson, M.S. 2001. Transcervical insemination techniques in the bitch. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 31(2): p. 291-304.