

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

“ANTONIO NARRO”

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**“MODIFICACIÓN DE LA TÉCNICA DE CONGELACIÓN DEL SEMEN CANINO
UTILIZANDO EXTENSORES COMERCIALES”**

POR:

JORGE LUIS GARCIA ESPAÑA

TESIS:

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA

OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAHUILA, MEXICO

DICIEMBRE 2012

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

“ANTONIO NARRO”

UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

“MODIFICACIÓN DE LA TÉCNICA DE CONGELACIÓN DEL SEMEN CANINO
UTILIZANDO EXTENSORES COMERCIALES”

POR:

JORGE LUIS GARCÍA ESPAÑA

ASESOR PRINCIPAL

Firma manuscrita de Jorge Luis García España.

MVZ CARLOS RAÚL RASCÓN DÍAZ

COORDINACIÓN DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

Firma manuscrita de Carlos Raúl Rascón Díaz.



M.V.Z. RODRIGO ISIDRO SIMON ALONSO

Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

DICIEMBRE, 2012

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



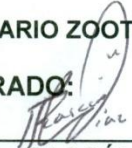
"MODIFICACIÓN DE LA TÉCNICA DE CONGELACIÓN DEL SEMEN CANINO
UTILIZANDO EXTENSORES COMERCIALES"

TESIS POR:
JORGE LUIS GARCÍA ESPAÑA

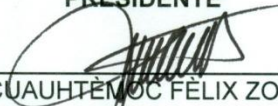
Elaborado bajo la supervisión del comité particular y aprobado como requisito parcial para
optar por el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

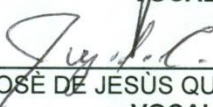
JURADO:



CARLOS RAÚL RASCÓN DÍAZ
PRESIDENTE



MVZ. CUAUHTÉMOC FÉLIX ZORRILLA
VOCAL



MC. JOSÉ DE JESÚS QUEZADA AGUIRRE
VOCAL



MVZ. EDMUNDO GUZMÁN RAMOS

VOCAL SUPLENTE



MVZ. RODRIGO ISÍDRO SIMÓN ALONSO
COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

DICIEMBRE, 2012

AGRADECIMIENTOS

A DIOS:

Por darme la vida

A LA UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO – UL:

Por permitirme realizar mi sueño de ser MVZ

AL M.V.Z. CARLOS RAÚL RASCÓN DÍAZ

ALA M.V.Z DIANA SALAZAR NEVARES

Y A TODOS MIS AMIGOS.

DEDICATORIA

A mi familia: por darme todo el apoyo necesario para poder cumplir la meta establecida, Porque sin ellos no estaría yo aquí.

RESUMEN

Se realizó un estudio de semen congelado en caninos, con la técnica del extensor CaniPRO™ Freeze A&B, con el fin de evaluar la motilidad y anomalías primarias y secundarias del semen congelado; y compararlo con el semen fresco; para verificar el resultado del proceso utilizado; por otra parte se comprobará por medio de la inseminación artificial en otro estudio comprobando la calidad espermática con el porcentaje de gestación obtenida.

En el estudio se utilizaron 5 machos, con diferente peso, raza, edad y clínicamente sanos. El estudio para este experimento fue realizando un examen de calidad espermática (motilidad, morbilidad, morfoanomalías), aceptando los animales que estuvieran aun por debajo de 150 millones de espermatozoides por mililitro; ya que nuestro interés es solamente el congelar las células espermáticas, aunado a esto sabemos que por debajo de esta media la probabilidad de éxito de la inseminación se verá afectada.

Para realizar esta técnica, se utilizo el kit comercial CaniPRO Freeze A&B para la congelación del semen; las características microscópicas en el semen fresco fueron prácticamente similares entre machos; sin embargo, tras el proceso de congelación, se observaron diferencias entre individuos en la calidad seminal, especialmente en la motilidad espermática, la cual disminuyo paulatinamente conforme el experimento avanza entre un 5% a 8% por día.

Cabe mencionar que el promedio de volumen eyaculado fue de 2.5 ml, lo cual nos da un promedio de diez pajillas por eyaculado, para la preservación.

Los resultados *in vitro* obtenidos en el estudio confirmaron que el uso de la congelación del semen es una alternativa potencial para conservar semen canino durante grandes periodos de tiempo. Concluyendo así, la técnica con semen congelado a 1,2,3,4 y 5 meses es eficiente y es de gran utilidad cuando tenemos un número mayor de hembras en las cuales podemos dosificar la cantidad de semen obtenido para posteriormente utilizarla.

De esta manera inseminamos un mayor número de hembras con la misma colecta de semen y a su vez podemos recorrer distancias largas o cortas para realizar la técnica, sin tener que movilizar al macho, y en fin un número de ventajas que se mencionan en el contexto del trabajo.

PALABRAS CLAVE:

- CaniPRO Freeze A&B
- Reproducción Canina
- Semen Canino.
- Congelación de Semen.
- Inseminación Artificial.

Contenido

AGRADECIMIENTOS.....	i
DEDICATORIA.....	ii
RESUMEN.....	iii
ÍNDICE DE TABLAS.....	vi
INDICE DE GRAFICOS.....	vi
I.- INTRODUCCIÓN.....	1
II.-ANTECEDENTES.....	4
III.ANATOMÍA DEL APARATO REPRODUCTOR DEL PERRO.....	4
3.1. Órganos genitales del macho.....	4
3.2. Glándulas genitales accesorias.....	6
3.3. Genitales externos.....	7
IV.- ENDOCRINOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN.....	9
4.1. Hormonas Hipotalámicas.....	9
4.1.1. Hormona liberadora de Gonadotropina (GnRH).....	9
4.2. Hormonas Hipofisarias	10
4.2.1. Hormona Folículo Estimulante (FSH).....	9
4.2.2. Hormona Luteinizante (LH).....	9
4.2.3. Prolactina.....	10
4.3. Hormonas foliculares.....	11
4.3.1. Estrógenos	11
4.3.2. Progesterona.....	12
4.3.3. Prostaglandinas.....	12
4.3.4. Andrógenos	12
4.3.5. Inhibina	12
V. FISIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN.....	13
5.1. Fisiología de la Reproducción del Macho.....	13
5.1.1. Espermatogénesis	13
5.1.2. Control de la temperatura.....	15
5.1.3. Transporte del semen.....	15
5.1.4. Erección.....	16
5.1.5. Eyaculación.....	17

VI. CARACTERÍSTICA DEL SEMEN FRESCO vs. CONGELADO.....	18
6.1.1. SEMEN FRESCO.....	18
6.1.2. SEMEN CONGELADO.....	19
VII.- OBJETIVOS.....	20
VIII.HIPOTESIS.....	21
IX. MATERIAL Y METODOS.....	22
X.-RESULTADOS.....	25
XI.-DISCUSIÓN.....	28
XII.- CONCLUSIÓN.....	30
XIII.- LITERATURA CITADA.....	31

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentración de semen y relación en ml del extensor.....	24
Tabla 2. Identificación del macho canino.....	25
Tabla 3. Comparación macroscópica y microscópica del semen obtenido.....	25
Tabla 4. Porcentaje de motilidad espermática (%ME) inicio al final del experimento.....	26

INDICE DE GRAFICOS

Grafico 1. Porcentaje de motilidad espermática de la media.....	26
Grafico 2. Porcentaje de la motilidad espermática por ejemplar.....	27

I.- INTRODUCCIÓN

En los últimos 20 años, las técnicas de inseminación artificial y criopreservación seminal en la especie canina han experimentado un enorme desarrollo. 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).

Cuando se utiliza semen congelado, el porcentaje de gestaciones obtenido es menor, particularmente si se realiza una técnica de inseminación intrauterina (Linde-Forsberg y Forsberg, 1989; Fontbonne y Badinand, 1993; Nöthling col., 1997). De manera general, se asume que el semen canino congelado puede ver reducida su capacidad fértil (Rijsselaere y col., 2002).

La prueba definitiva para evaluar la fertilidad del semen canino congelado mediante cualquier protocolo de criopreservación 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 congelado 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 LindeForsberg, 2000a,b; Peña y col., 2003; Álamo 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 post-congelación parece ser el mejor indicador de la fertilidad seminal (Nöthling y col., 1997).

Por otro lado, en la mayoría de estudios desarrollados en la especie canina, antes del procesamiento del semen, se hace un acumulo de los eyaculados de machos diferentes (Hay y col, 1997; Peña y Linde-Forsberg, 2000a; Peña y col, 2003), por lo que resulta imposible establecer si existe variación individual.

En la especie canina, se han desarrollado diferentes protocolos de criopreservación seminal utilizando diferentes tipos de diluyentes (Dobrinski y col., 1992; Fontbonne y Badinand, 1993; Nöthling y col., 1997; Ström y col., 1999). El porcentaje de fertilidad tras realizar una inseminación con semen congelado varía entre un 35-45% (Silva y Verstegen, 1995; Silva y col., 1996). Por otro lado, los perros muestran una gran variabilidad en la calidad seminal pos congelación, (Peña y col., 2003). Por tanto, parece necesario desarrollar nuevas técnicas de criopreservación seminal para obtener mayores porcentajes de fertilidad tras la realización de una inseminación artificial con semen congelado. Sin embargo, el bajo número de animales utilizados en este trabajo, hace necesario completar esta investigación utilizando un mayor número de animales y conservando las muestras durante periodos de tiempo más largos.

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 (Stornelli y col. 2007).

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 criopreservación de semen ha hecho posible la distribución por el mundo de material genético a un bajo costo. Diversas metodologías de criopreservación de semen, se están aplicando cada vez con más frecuencia con el fin de establecer bancos de reserva genética para conservar las diferentes especies en el futuro (Luvoni GC. 2000). Las especies en vías de extinción son los principales impulsores y receptores de esta corriente (Stornelli y col. 2007).

Es así que en el mundo, por aproximadamente 5 décadas, muchas camadas han nacido a partir de IA con semen fresco, refrigerado y congelado. Sin embargo las tasas de preñez obtenidas a partir de IA usando semen congelado son aún poco satisfactorias y esto ocurre en particular con las obtenidas bajo condiciones clínicas (stornelli y col. 2007).

En la clínica reproductiva diaria las variables asociadas al manejo del semen en la congelación, la técnica de IA implementada y a 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 (Farstad, W. 2000).

Estos hechos se relacionan tanto con las particularidades de la fisiología reproductiva de la hembra como con la especial sensibilidad del semen canino a los procesos de criopreservación y la falta de desarrollo en esta área (Jhonston, 2001). Es así que son necesarias investigaciones dirigidas a mejorar la habilidad para mantener la capacidad fecundante del semen congelado en caninos y obtener así tasas de preñez y tamaños de camada satisfactorios (stornelli y col 2007).

II.- ANTECEDENTES

Hasta hace poco tiempo, se practicaba IA exclusivamente con semen fresco, posteriormente comenzó a utilizarse semen refrigerado y congelado. En muchos países de Europa así como en Estados Unidos, la IA con semen congelado es una práctica rutinaria. Este método de criopreservación de semen puede ser implementado con bajo costo, fácil manejo y moderada infraestructura, mejorando así las posibilidades del uso del semen de reproductores valiosos (Sánchez, A.2000).

III. ANATOMÍA DEL APARATO REPRODUCTOR DEL PERRO

3.1. Órganos genitales del macho

3.1.1. 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).

3.1.2. Testículos

Los testículos del macho canino son relativamente pequeños, tienen forma oval o redondeada, su eje mayor es oblicuo y está 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).

3.1.3. 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).

3.1.4. 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 craneodorsal 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).

3.1.5. Cordón espermático (funículos spermaticus)

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, demodo que no existe anillo vaginal (Sisson *et al.*, 1993).

3.1.6. 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).

3.2. Glándulas genitales accesorias

3.2.1. Glándulas vesiculares

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

3.2.2. 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 esconocida como fluido prostático, y constituye la primera y tercera fracción deleyaculado; tiene poder bactericida (Allen, 1992).

3.2.3. Glándulas bulbo uretrales

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

3.3. Genitales externos

3.3.1. Pene

El pene está compuesto de raíz, cuerpo y glande. En su parte caudal existendos cuerpos cavernosos visibles, separados por un tabique medio. En su partecraneal 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 librepuntiagudo, constituye las tres cuartas partes distales del glande y termina en laabertura de la uretra; caudalmente existe un alargamiento redondeado, llamadobulbo del glande, que sin erección es difícil de apreciar, pero que cuando el penese encuentra en erección consiste en un abultamiento más o menos esféricoresponsable de la fijación del pene en la vagina de la perra durante elapareamiento (Allen, 1992; Sisson *et al.*, 1993).

3.3.2. 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 glándulo 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).

3.3.3. 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).

IV.- ENDOCRINOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

4.1. Hormonas Hipotalámicas

4.1.1. 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), estas 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 bulboolfactorio y señales luminosas que actúan en la retina. La dopamina, opioides 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 la 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).

4.2. Hormonas Hipofisarias

4.2.1. 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).

4.2.2. Hormona Luteinizante (LH)

Es producida en la adenohipófisis por estimulación de la hormona liberadora de gonadotropinas hipotalámicas (GnRH) (Ruckebusch *et al.*, 1991). En la hembra es liberada en forma de pulsaciones cortas y la frecuencia de estas 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).

4.2.3. 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).

4.3. Hormonas foliculares

4.3.1. Estrógenos

Hormonas esteroideas producidas en la perra por folículos en crecimiento.

Los principales son 17 -estradiol, 17 -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

4.3.2. 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).

4.3.3. 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)

4.3.4. 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 pg/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).

4.3.5. 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)

V. FISIOLÓGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

5.1. 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).

5.1.1. 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 *espermatoцитos*. Los espermatoцитos 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 centriolos 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 directamenteproporcional al tamaño testicular. El semen se guarda en los compartimentos 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).

5.1.2. 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:

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

5.1.3. 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).

5.1.4. 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).

5.1.5. 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 esta 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 losperros 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 (Davol,2001). Al final de la eyaculación se produce la desinflamación del pene y su retirada de la vagina (Allen, 1992).

VI. CARACTERÍSTICA DEL SEMEN FRESCO vs. CONGELADO.

6.1 Semen fresco vs. Congelado

6.1.1. SEMEN FRESCO

Solamente se utiliza la segunda fracción (rica en espermatozoides); la misma se recoge en forma independiente (Allen, 1992). La recolección de la fracción espermática es suficiente para realizar la IA, parte de la fracción prostática puede recolectarse sólo para asegurarse que se ha recolectado toda la segunda fracción. Si el volumen de la fracción espermática es escaso, La fracción prostática puede servir para aumentarlo y facilitar el manejo del semen (Stornelli et al., 2006).

Para cada inseminación se utiliza un eyaculado, es decir no constituye un procedimiento para aumentar el número de perras inseminadas (Allen, 1992). La

inseminación deberá efectuarse en un plazo no mayor a 15 minutos (Allen, 1992; Esquivel, 2002).

El semen fresco usado en intervalos de inseminación de 48 horas se ha demostrado favorable, considerando que con semen conservado el intervalo de la inseminación no debe exceder 24 horas (Gunzel, 1986).

La tasa de gestación obtenida con el semen fresco es 60% aproximadamente (Allen, 1992, Esquivel, 2002). Con el semen congelado disminuye notablemente este porcentaje y el tamaño de camada es 21.5% más pequeño en perras inseminadas con semen fresco, comparando con perras naturalmente apareadas (Linde-Forsberg y Forsberg, 1989).

6.1.2. SEMEN CONGELADO

Enviar el semen en lugar de enviar la perra se ha hecho común. Los criadores han escogido la utilización del semen congelado por inseminación intrauterina para sus perras, en espera de buenas proporciones de concepción (Hutchinson, 2001).

Mediante el agregado de diluyentes, el semen puede ser congelado y de esta manera conservado y transportado. Las bajas temperaturas disminuyen las tasas metabólicas de los espermatozoides y prolongan su longevidad. Los diluyentes protegen a las membranas del espermatozoides del daño causado por los cambios de temperatura, proveen energía y mantienen estables el pH y la osmolaridad. Los antibióticos agregados a los diluyentes evitan la proliferación bacteriana, en especial en los que contienen yema de huevo (Estornela et al., 2006). Sin embargo, el congelar el semen produce un aumento inmediato en el número de anomalías del cromosoma y una disminución subsecuente en la en la viabilidad del semen (Borges et al., 2001).

Las tasas de preñez obtenidas utilizando semen congelado son de 35-45% (W. Edward, 1992). Según (Linde-Forsberg, 2000) la tasa de parición con este mismo semen es de 45.1% y el tamaño de camada es de 2.8+/-1.0.

VII.- OBJETIVOS

Congelar semen canino, utilizando extensores comerciales.

Evaluar la motilidad y concentración del semen congelado mensualmente de junio a septiembre.

VIII.- HIPÓTESIS

La congelación del semen canino con el diluyente del extensor comercialmantendrá la motilidad y concentración del mismo una vez procesado.

IX. MATERIAL Y METODOS

Se realizo un estudio en la Ciudad de Torreón, Coahuila, dentro de las instalaciones del Hospital de Pequeñas Especies de la UAAAN UL; Paradeterminar la motilidad progresiva del semen canino congelado a 1, 2, 3, 4 y 5 meses utilizando el diluyente de extensores comerciales. El semen se recolecto pormasturbación del perro en un piso no resbaladizo, a fin de facilitar la eyaculación se contó con la presencia de una perra en celo, tomando en cuenta el menor número de personas para evitar estrés del canino. Para este trabajo de investigación se ocuparon 5 machos de diferentes; edades, pesos y razas, clínicamente sanos.

9.1 Material utilizado para la Toma y procesamiento de la muestra del semen:

Extensores comerciales

Guantes látex

Microscopio.

Vaso de precipitado

Matraz erlenmeyer

Pipeta de tomas.

Cámara de newbauer.

Pipetas.

Porta objetos

Cubre objetos

Centrifuga.

Pajillas de .5 ml.

Termo para semen congelado.

Evaluación del macho: En los perros se realizó un examen andrológicocompleto, para así saber si los machos se encontraban en óptimas condiciones para su reproducción (Feldman y Nelson, 1996).

Protocolo para el medio CaniPRO TMFreeze A&B.

Preparación:

Colocar en baño maría el extender CaniPRO TMFreeze A&B.

La colección del semen:

- Se utiliza únicamente la fracción rica en espermatozoides del eyaculado (segunda fracción) en dado caso si es para la inseminación, no incluya la primera fracción del eyaculado (fracción prostática claro antes de la fracción rica en espermatozoides) o latercera fracción (fracción prostática posterior a la fracción rica en espermatozoides) de la eyaculación en la muestra porque la calidad del semen puede disminuir.
- Una vez colectado el semen se evaluó macros y microscópicamente cuidando que cumpliera con las características y los criterios mínimos para su proceso.
- Se diluyó el semen con el extender en una relación de 1 ml de semen: 3-5 ml de CaniPRO TMFreeze A&B tomando en cuenta laconcentración inicial.

Tabla 1.- Concentración del semen y relación en ml de extensor

La concentración del semen canino (106)	La relación de semen por ml de extensor
250 – 750	1 – 3
750 – 1.25	1 – 4
Por encima de 1.25	1 – 5

El semen se conservara durante 5 meses en nitrógeno líquido con la preservación de un mínimo de 80% de motilidad inicial. Evite cambios de temperatura durante la conservación mediante la colocación de la sonda con el semen mediante un baño María, evitando así un choque térmico.

- La motilidad y concentración se evaluara mes a mes.

X. RESULTADOS

Cabe mencionar, que el objetivo de este trabajo fue valorar la motilidad progresiva y la viabilidad durante los 5 meses de la congelación, lo cual indico que el porcentaje de motilidad y viabilidad cuando se comparaban entre sí los diferentes ejemplares; la motilidad tenía un valor alrededor del 90% (rango individual: 80-95%) mientras que la viabilidad media era superior al 80% (rango individual: 80-95%). La media de morfoanomalías fue inferior al 6%.

Tabla 2. Identificación del macho canino.

Macho	Razas	Edad
1	Cobrador de Labrador	8 Años
2	Doberman	2 Años
3	Pastor Alemán (1)	6 Años
4	Golden Retriever	3 Años
5	Pastor Alemán	5 Años

Tabla 3. Comparación macroscópica y microscópica del semen obtenido.

Macho	V.E (ml)	Conc.x10⁶ml	%M	%V	%MA
1	3	100	90	88	5
2	2.5	90	85	80	5
3	2.5	85	90	78	6
4	2	80	90	75	6
5	3.5	150	85	85	5
media	2.5	90	90	80	5

Tabla 3.

Comparación macroscópica y microscópica del semen obtenido

VE= Volumen eyaculado **M=** Motilidad **V=** Viabilidad **MA=** Morfoanomalias

En la tabla 3; se puede observar que al evaluar el semen macro y microscópicamente de los animales en experimento, no hubo una diferencia significativa ($p < 0.05$), sin embargo, numéricamente sí.

El porcentaje de motilidad espermática (media) obtenido a lo largo del periodo experimental se expresa en la Tabla 4 con la utilización del ExtenderCaniPRO™ Freeze A&B, la motilidad espermática se situó alrededor del 55-90% con un promedio del 71%, cabe mencionar que no existió diferencias significativas dentro de cada macho a lo largo de todo el periodo experimental.

Tabla 4. Porcentaje de Motilidad Espermática (%ME) del inicio al final del experimento.

Macho	ME (%) M1	ME (%) M2	ME (%) M3	ME (%) M4	ME (%) M5
1	90	88	85	80	77
2	85	84	83	78	75
3	90	88	84	79	76
4	90	89	83	77	74
5	85	84	80	76	73
MEDIA	90	87	83	78	75

Grafico 1. Porcentaje de Motilidad Espermática de la Media

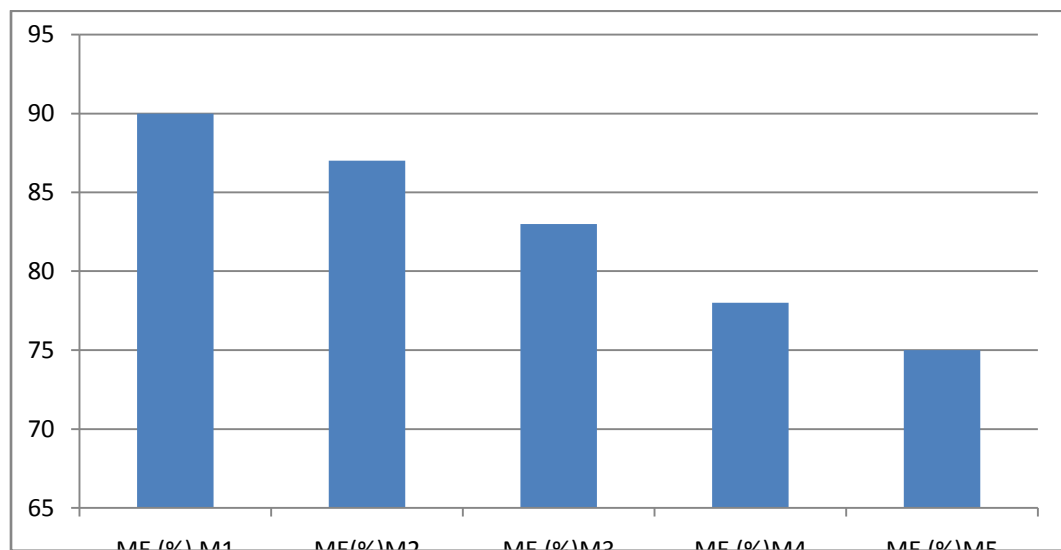
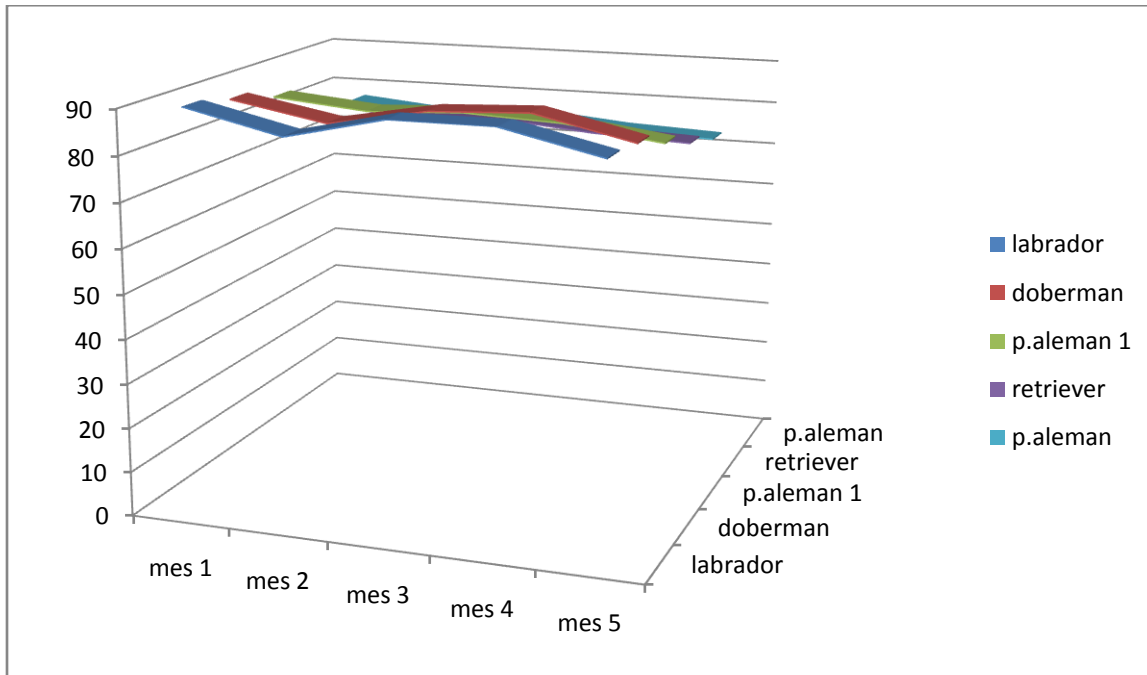


Grafico 2. Porcentaje de Motilidad por ejemplar



XI. DISCUSIÓN

Este trabajo experimental muestra, en primer lugar, que los resultados obtenidos después de congelar y conservar el semen canino con el Extender CaniPRO™ Freeze A&B, confirman plenamente los resultados obtenidos en estudios realizados por otros autores. Además, los resultados de este estudio demuestran claramente que existen variaciones individuales no significativas en la calidad seminal post-congelación.

Existe un gran número de trabajos que han tratado de establecer la calidad del semen canino, antes y después de la refrigeración (Olar y col., 1989; Silva y col., 1996; Nöthling y col., 1997; Rigau y col., 2001). La mayoría de esos trabajos de investigación han sido desarrollados utilizando machos de diferentes razas y sólo existen unos pocos trabajos donde la calidad seminal se ha definido en una raza en concreto. En nuestro estudio en fresco, los valores medios de motilidad y vitalidad eran similares o ligeramente superiores que los descritos para otras razas.

Además, el número de morfoanomalías era inferior al 7%, siendo comparable con los resultados descritos por la mayoría de los autores. Sin embargo, la concentración seminal de nuestros machos (valor medio: 90 x 10 esp/ml) está dentro de los descritos en otros estudios.

La motilidad del semen congelado con el Extender CaniPRO Freeze A&B, oscilaba entre un 60-80% durante el periodo experimental, siendo nuestros resultados comparables a los obtenidos en otros trabajos que utilizan otras técnicas para congelar y conservar semen canino. Dentro de cada ejemplar, la motilidad espermática se modificaba muy ligeramente a lo largo del periodo experimental, indicando que este parámetro seminal permanece inalterable durante la congelación.

Con respecto a la viabilidad espermática, en la congelación, los valores medios de espermatozoides vivos eran prácticamente similares a los de otros autores. En la mayoría de estudios, tras la congelación, el porcentaje de viabilidad del semen canino variaba entre 75 y 90%.

Estos resultados indican que la variabilidad individual tiene menos influencia sobre el porcentaje de vitalidad postcongelación que en el porcentaje de motilidad.

En la mayoría de los estudios, el porcentaje de morfoanomalías alcanza valores entre el 10-25% tras la congelación. En nuestro estudio, el porcentaje de morfoanomalías mostraba un valor medio de no más de 7 %.

En nuestro estudio, las características seminales en fresco fueron prácticamente similares entre todos los machos; sin embargo, tras el procesado y congelación seminal, se observaron diferencias en la calidad seminal entre machos, especialmente en la motilidad.

La motilidad progresiva es el parámetro más frecuentemente determinado para la evaluación de la calidad seminal del semen canino congelado. Además, otros estudios muestran una correlación positiva entre el porcentaje de motilidad progresiva y el porcentaje de morfoanomalías. Se puede afirmar que la motilidad podría ser un buen indicador de la calidad seminal post-congelación, y por tanto, ser un parámetro básico para determinar la capacidad fértil del semen canino tras la congelación.

Los resultados obtenidos en el estudio confirman que el uso de la técnica de congelación utilizando el Extender CaniPRO™ Freeze A&B, para conservar semen canino es de gran utilidad.

XII. CONCLUSIÓN

La clave para tener éxito en cualquier programa de la cría es la planeación. Esto es importante cuando se trata de semen congelado. Yo discutí muchas cosas que creo deben ser consideradas en una cría de este tipo. Ahora que nosotros tenemos colectado y preparado un producto de buena calidad de semen congelado, pensamos en la perra reproductora.

En situaciones donde tenemos una cantidad muy limitada de semen, o no tenemos un número muy grande de dosis para inseminar, es muy importante planear una cría con una perra probada. 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 de la gestación sin complicaciones.

Todas las perras, primerizas o no, debe examinarse para: *Brucella canis*, TVT y micoplasma. Estas infecciones se transmiten durante el apareamiento y el contacto casual podría transmitir estas enfermedades de un animal a otro sin reproducirse.

LITERATURA CITADA

1. Abusineina, M.E.: A study of the fern-like crystalline patterns of the cervical and vaginal mucus of cattle. *Vet. Rec.*, 74: 619-621 (1962).
2. ALLEN, E. 1992 Fertility and obstetrics in the dog. Oxford (England): Blackwell Scientific publications limited. p. 1-175.
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. Concannon P.W., England G., Verstegen J. and Linde-Forsbers.2001. Uso de kits comerciales para ensayos de hormona luteinizante y de progesterona en el manejo reproductivo canino.
5. DAVOL, P. A. 2000. Canine Reproduction. Part 1: Reproduction and the male dog. <http://www.labbies.com/reproduction4.htm>. (consulta: 10 de agosto 2004).
6. Desachy Forence; 2000, La reproducción del perro; primer edición; editorial Vecchi.
7. ESQUIVEL, L. C. 2002 Reproducción en pequeñas especies. Memoria de la XII de ciencia Animal; 2002 28 Octubre- 2 de Noviembre; Torreón Coahuila. México. Formato electrónico.
8. EDWARD C, Feldman, Richard w, Nelson; 2000; Endocrinología y reproducción en perros y gatos; segunda edición, editorial McGraw- Hill interamericana.
9. FARSTAD, W. 2000. Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology*, 53 (1): p.175-86.

10. FOSTER, R. Y M. Smith. 2001. Artificial Insemination (AI). petEducation.
<http://www.peteducation.com/repro/AI.htm>.
11. GUNZEL, A. R. 1986. Sperm collection, evaluation, preservation and artificial insemination in the dog. Tierarztl prax, 14(2):p.275-82.
12. HEAPE, W. 1897. Artificial insemination of mammals and the subsequent fertilization or impregnation of their ova. Proc Royal Soc. London: 61: 52-56.
13. HUTCHISON, R. V. 2001. Canine Reproduction for Breeders, Seminar. Company at the 2001 Westminster kennel club show.
<http://www.amchesssieclub.org/conception.html>
14. JHONSTON, D. J., M.V.R. Kuztritz y P. Olso. 2001. Canine and feline theriogenology. Philadelphia (United State): Ed. Saunders.16:287-306.
15. MaybeMOM; TEST DE SALIVA. Consulta de internet.
http://www.maybemom.com/es/how_works
16. MC DONAL, 1975. Veterinary Endocrinology and reproduction. 2Ed. Leaend Febiger.
17. MORTON, D.B. 1986. Review on the use of frozen semen in dog breeding. Animal Technology, 37(1):p.67-71.
18. NURIA DE BUEN DE ARGUERO. 2001. Citología diagnóstica veterinaria, Editorial Manual moderno.

19. PERÉZ, O. A. 2001. Historia Veterinaria: Verdades y mitos sobre lo que han hecho los veterinarios.

<http://www.visionveterinaria.com/historia/04dic2001.htm>.

20. PURSWELL, B. J. Y N. A. PARKER 2000. Modern breeding management in dogs. Veterinary Medicine.

<http://www.hilltopanimalhospital.com/moder%20breeding%management.htm>.

21. 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.609-16.

22. SACHEZ, A. 1998. INSEMINACION ARTIFICIAL EN PERROS. IV Curso internacional de medicina y cirugía en pequeños animales. MEVEPA V Región- Universidad de Chile. Concon, Chile, pp.122-131.

23. SÁNCHEZ, A. 2000. Examen clínico reproductivo en la perra doméstica, Curso Tópicos en reproducción de pequeños animales. Universidad de Chile. Santiago, Chile, pp. 60-66.

24. SISSON, S., J. D. Grossman y R. Getty. 1993. Anatomía de los animales domésticos. 5 Ed. Tomo II, México: Salvat.P. 1728-41..

25. STORNELLI, M. A., y L. Sota. 2007. Inseminación artificial con semen fresco, refrigerado y congelado. Aplicación y desarrollo en caninos. ANALECTA VETERINARIA, 21,1: p.1728-41.

26. VEGA GORDO, L; Matas parra, C., 1998 Tecnología de la inseminación artificial en caninos.

27. VILLALBA, G. A.1997 La inseminación artificial. Infomascota.

<http://www.infomascota.com>.