

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



TÉCNICAS DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN CANINOS

POR

JOSÉ RAMÓN VILLARREAL SIMENTAL

MONOGRAFÍA

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL TÍTULO DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAHUILA

DICIEMBRE DE 2002

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



**TÉCNICAS DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN CANINOS
MONOGRAFÍA**

ASESOR PRINCIPAL

M.V.Z. JOSÉ LUIS FRANCISCO SANDOVAL ELIAS

COLABORADOR

M.V.Z. CARLOS RAÚL RASCÓN DÍAZ

COLABORADOR

M.V.Z. ERNESTO MARTÍNEZ ARANDA

TORREÓN, COAHUILA

DICIEMBRE DE 2002

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

UNIDAD LAGUNA

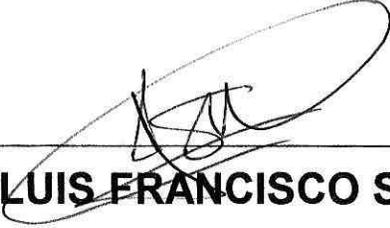
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

TÉCNICAS DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN CANINOS

MONOGRAFÍA

APROBADO POR EL COMITÉ DE MONOGRAFÍA

PRESIDENTE DEL JURADO



M.V.Z. JOSÉ LUIS FRANCISCO SANDOVAL ELIAS

**COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL
DE CIENCIA ANIMAL**



M.V.Z. ERNESTO MARTÍNEZ ARANDA



Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal
UAAAN - UL

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

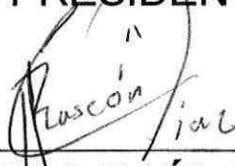
UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

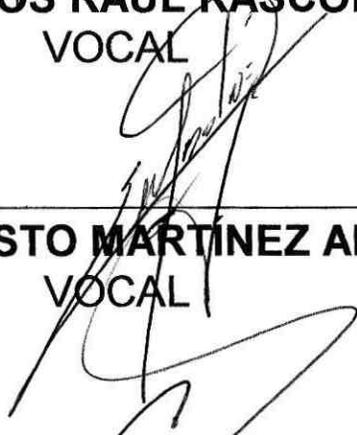
TÉCNICAS DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN CANINOS



M.V.Z. JOSÉ LUIS FRANCISCO SANDOVAL ELIAS
PRESIDENTE



M.V.Z. CARLOS RAÚL RASCÓN DÍAZ
VOCAL



M.V.Z. ERNESTO MARTÍNEZ ARANDA
VOCAL



M.C. JORGE ITURBIDE RAMÍREZ
VOCAL SUPLENTE

Agradecimientos:

A Dios, porque me ha permitido realizar éste sueño, que compartí con mucha gente que siempre me apoyó.

A mis padres José Ramón y Dora, por todo éste tiempo de paciencia que me brindaron en el transcurso de mi carrera, y por todo el apoyo que siempre recibí por parte de ellos.

A mi Universidad, porque siempre será mi "Alma Terra Mater".

A mis tías, Patricia y Silvia, porque durante mi estancia en Torreón, siempre me apoyaron.

A mis hermanos Dora, Jesús Francisco y María Patricia, que siempre compartieron todo conmigo, situaciones buenas y malas, sueños y realidades.

A Erika Fabiola, que siempre ha sabido comprender mis anhelos, y que forma parte de ellos.

A todos mis amigos y compañeros con los que conviví en el transcurso de mi carrera..

A mis asesores y colaboradores, por su apoyo en la realización de éste trabajo.

A Gilberto Linares y Carlos Rascón, que son parte fundamental en éste trabajo.

Y a todos mis maestros, que contribuyeron a mi formación profesional.

Muchas gracias.

Dedicatoria:

A mis padres, José Ramón y Dora, que se han esforzado junto conmigo, y todo su apoyo ha sido incondicionalmente.

A todos mis seres queridos, que no menciono por temor a olvidar a alguno.

A la memoria de todos mis seres queridos que ya no pueden estar conmigo.

INDICE:

INTRODUCCIÓN	1
I. ANATOMÍA DEL APARATO REPRODUCTOR DEL PERRO	2
1.1. Macho	2
1.1.1. Órganos genitales del macho.....	2
1.1.1.1. Escroto.....	2
1.1.1.2. Testículos.....	2
1.1.1.3. Epidídimo.....	2
1.1.1.4. Conductos deferentes.....	3
1.1.1.5. Cordón espermático (funículos spermaticus)	3
1.1.1.6. Canal inguinal.....	3
1.1.2. Glándulas genitales accesorias.....	4
1.1.2.1. Glándulas vesiculares.....	4
1.1.2.2. Próstata.....	4
1.1.2.3. Glándulas bulbouretrales.....	4
1.1.3. Genitales externos.....	4
1.1.3.1. Pene.....	4
1.1.3.2. Prepucio.....	5
1.1.3.3. Uretra masculina.....	5
1.2. Hembra	5
1.2.1. Órganos genitales de la hembra.....	5
1.2.1.1. Ovarios.....	5
1.2.1.2. Trompas uterinas.....	6
1.2.1.3. Útero.....	7
1.2.1.4. Cérvix.....	7
1.2.1.5. Vagina.....	7
1.2.1.6. Vestíbulo vaginal.....	8
1.2.2. Genitales externos.....	8
1.2.2.1. Vulva.....	8
1.2.2.2. Clítoris.....	9
1.2.2.3. Uretra femenina.....	9
1.2.2.4. Glándulas mamarias.....	9
II. ENDOCRINOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN	10
2.1. Hormonas Hipotalámicas	10
2.1.1. Hormona liberadora de gonadotropina (GnRH)	10
2.2. Hormonas Hipofisarias	10
2.2.1. Hormona Folículo Estimulante (FSH)	10
2.2.2. Hormona Luteinizante (LH)	11
2.2.3. Prolactina.....	11

2.3. Hormonas foliculares	12
2.3.1. Estrógenos.....	12
2.3.2. Progesterona.....	12
2.3.3. Prostaglandinas.....	13
2.3.4. Andrógenos.....	13
2.3.5. Inhibina.....	13
III. FISIOLÓGÍA DE LA REPRODUCCIÓN	14
3.1. Fisiología de la Reproducción del Macho	14
3.1.1. Espermatogénesis.....	14
3.1.2. Control de la temperatura.....	15
3.1.3. Transporte del semen.....	16
3.1.4. Erección.....	16
3.1.5. Eyaculación.....	17
3.2. Fisiología de la Reproducción de la Hembra	18
3.2.1. Ovogénesis.....	19
3.2.2. Fisiología del ciclo estral.....	19
3.2.2.1. Etapas del ciclo estral.....	21
a) Proestro.....	21
b) Estro.....	22
c) Metaestro.....	23
d) Diestro.....	24
e) Anestro.....	25
IV. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE ESTRO	27
4.1. Citología Vaginal	27
4.1.1. Fundamento de la citología vaginal exfoliativa.....	27
4.1.2. Clasificación de las células vaginales.....	28
4.1.3. Tipos de células presentes en cada fase del ciclo estral.....	28
4.1.3.1. Proestro.....	28
4.1.3.2. Estro.....	29
4.1.3.3. Diestro.....	29
4.1.4. Técnica de citología vaginal exfoliativa.....	29
4.2. Vaginoscopía	30
V. DETECCIÓN DE LA OVULACIÓN	31
5.1. Métodos de Diagnóstico de la ovulación	31
5.1.1. Señales fisiológicas.....	31
5.1.2. Monitoreo de estrógeno.....	32
5.1.3. Pico de la Hormona Luteinizante (LH).....	32
5.1.3.1. Pruebas para la determinación de los niveles de Hormona Luteinizante... 33	33

5.1.3.1.1. Prueba de orina.....	33
5.1.3.1.2. Prueba en suero.....	33
5.1.4. Aumento de Progesterona.....	33
5.1.5. Citología vaginal.....	35
VI. HISTORIA DE LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL.....	35
6.1. Origen de la Inseminación Artificial (IA)	35
6.2. Historia de la Inseminación Artificial en Caninos.....	35
VII. INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN CANINOS.....	38
7.1. Objetivos de la Inseminación Artificial en Caninos.....	38
7.2. Causas de Uso de la Inseminación Artificial en Caninos.....	39
7.2.1. Causas de uso de la Inseminación Artificial en hembras.....	39
7.2.2. Causas de uso de la Inseminación Artificial en machos.....	40
7.3. Ventajas y Desventajas de la Inseminación Artificial en Caninos.....	40
7.4. Limitaciones de la Inseminación Artificial en Caninos.....	42
VIII. EVALUACIÓN DE LOS REPRODUCTORES.....	42
8.1. Evaluación del macho reproductor.....	42
8.2. Evaluación de la hembra reproductora.....	43
8.2.1. Cultivo vaginal.....	43
a) Desventajas del cultivo.....	44
8.2.2. Brucella canis.....	44
IX. COLECCIÓN DE SEMEN PARA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN CANINOS.....	45
9.1. Equipo Necesario para Realizar la Colección de Semen Canino.....	46
9.2. Manejo del Semen Canino para la Inseminación Artificial.....	47
9.3. Evaluación del Semen Canino.....	48
9.3.1. Evaluación Macroscópica del semen canino.....	50
9.3.1.1. Volumen.....	50
9.3.1.2. Color.....	51
9.3.1.3. Olor.....	51
9.3.1.4. pH.....	51
9.3.2. Evaluación Microscópica del semen canino.....	51

9.3.2.1. Evaluación de la motilidad espermática.....	52
9.3.2.2. Concentración espermática.....	52
9.3.2.3. Cuenta espermática total.....	53
9.3.2.4. Relación de espermatozoides vivos y muertos.....	54
9.3.2.5. Análisis morfológico de las células espermáticas.....	54
a) Anormalidades primarias.....	55
b) Anormalidades secundarias.....	56
9.3.2.6. Otras células.....	57
9.3.3. Cultivo del semen.....	57
9.3.4. Evaluación del "Hamilton Thorn" basada en un sistema automatizado computarizado.....	57
9.4. Métodos de preservación del semen.....	57
9.4.1. Semen fresco.....	59
9.4.2. Semen refrigerado.....	59
9.4.2.1. Técnica para la refrigeración del semen.....	60
9.4.3. Semen congelado.....	62
9.4.3.1. Técnica de congelación de semen.....	63
9.4.3.2. Técnica para descongelar semen canino.....	63
9.4.3.3. Supervivencia del espermatozoide después de descongelar.....	64
X. TÉCNICAS DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN CANINOS.....	67
10.1. Tiempo de Inseminación.....	68
10.2. Dosis de Inseminación.....	69
10.3. Inseminación Artificial Intravaginal.....	69
10.4. Inseminación Intrauterina.....	72
10.4.1. Inseminación intrauterina transcervical.....	73
10.4.2. Inseminación intrauterina quirúrgica.....	75
CONCLUSIÓN.....	77
LITERATURA CITADA.....	78

INTRODUCCIÓN

La Inseminación Artificial (IA) en caninos es una práctica que brinda grandes beneficios en la clínica reproductiva diaria. Esta biotecnología puede ser de moderada o alta complejidad, de bajo o mediano costo, según la técnica y el tipo de semen (fresco, refrigerado o congelado) utilizado. En cada caso brinda diferentes posibilidades otorgando siempre grandes beneficios en la reproducción canina (Stornelli *et al.*, 2001).

Muchos criadores de perros y veterinarios han encontrado en la Inseminación Artificial (IA) una herramienta invaluable, ya que la ven como una opción para aumentar la calidad de una raza superando limitaciones de tiempo y espacio (Foster y Smith, 2001).

Si se extrae semen de buena calidad, se le acondiciona y maneja adecuadamente, se realiza la IA en el momento oportuno y se aplica la técnica adecuada, se pueden obtener porcentajes de fertilidad muy buenos. Sin embargo, si los factores antes mencionados no son adecuadamente controlados puede tornarse una práctica sin buenos resultados. La aplicación de IA con semen criopreservado aumentará las posibilidades de desarrollo del profesional veterinario en nuestro país (Stornelli *et al.*, 2001).

En la actualidad, los métodos de Inseminación Artificial son relativamente fáciles y son realizados por muchos criadores y por la mayoría de las clínicas veterinarias (Foster y Smith, 2001).

I. ANATOMÍA DEL APARATO REPRODUCTOR DEL PERRO

1.1. Macho

1.1.1. Órganos genitales del macho

1.1.1.1. 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. Ésto facilita el desarrollo óptimo de los espermatozoides (Cunningham, 1999; Davol, 2000).

1.1.1.2. 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).

1.1.1.3. 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).

1.1.1.4. 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).

1.1.1.5. 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, de modo que no existe anillo vaginal (Sisson *et al.*, 1993).

1.1.1.6. 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)..

1.1.2. Glándulas genitales accesorias

1.1.2.1. Glándulas vesiculares

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

1.1.2.2. 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).

1.1.2.3. Glándulas bulbouretrales

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

1.1.3. Genitales externos

1.1.3.1. 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).

1.1.3.2. 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).

1.1.3.3. 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).

1.2. Hembra

1.2.1. Órganos genitales de la hembra

1.2.1.1. Ovarios

Los ovarios son pequeños, tienen forma oval alargada y son aplanados, y su tamaño depende de la fase del ciclo estral en la que se encuentre la hembra. La longitud media es de 2 cm. en la perra (Allen, 1992; Sisson *et al.*, 1993).

Cada ovario está situado comúnmente a corta distancia (1 a 2 cm.) caudal, o bien, en contacto con el polo caudal del correspondiente riñón, y por tanto, asienta a la altura de las vértebras L III o L IV, o la mitad del recorrido existente entre la última costilla y la cresta del ilion. El ovario derecho asienta entre la parte derecha del duodeno y la pared abdominal lateral. El izquierdo está relacionado lateralmente con el bazo (Esquivel, 2002; Sisson *et al.*, 1993).

En la perra cada ovario está completamente envuelto por la bolsa ovárica, que tiene una hendidura que se abre centralmente. Las dos capas que forman esta bolsa contienen una gran cantidad de grasa y músculo liso. Se continúan por el cuerno del útero, para constituir el mesosalpinx y el ligamento propio del ovario (Sisson *et al.*, 1993). El ovario es considerado como glándula de función exócrina por la liberación de óvulos; y de función endócrina por su producción hormonal (Esquivel, 2002).

1.2.1.2. Trompas uterinas

Las trompas uterinas (falopianas) son estructuras tubulares que tienen de 5 a 8 cm de longitud (Sisson *et al.*, 1993). Comunican al ovario con el útero, constan de un istmo en el extremo uterino y de una ampolla más ancha (cuando se produce fertilización) en el extremo ovárico (Allen, 1992; Esquivel, 2002).

Se encuentran sostenidas por el mesosalpinx y están formados por tres porciones:

- 1) *Infundíbulo*: Tiene forma de embudo y está cerca del ovario, es la estructura que capta al óvulo cuando es liberado.
- 2) *Ampolla*: Es la porción media y su lumen es de diámetro más amplio que el istmo.
- 3) *Istmo*: Es la conexión del cuerno úterino con el oviducto (Esquivel, 2002).

1.2.1.3. Útero

El cuerpo del útero es muy corto y tiene dos cuernos extremadamente largos (Allen, 1992; Esquivel, 2002; Sisson *et al.*, 1993). En una perra de tamaño medio, el cuerpo mide 2 a 3 cm y los cuernos 12 a 15 cm de largo (Esquivel, 2002; Sisson *et al.*, 1993), pero la longitud y la anchura del útero dependen de cambios tanto patológicos como fisiológicos (Allen, 1992). Estos cuernos son de diámetro uniforme, casi rectos y asientan totalmente dentro del abdomen. Divergen del cuerpo en forma de V hacia cada riñón. Sus partes caudales están unidas por el peritoneo (Sisson *et al.*, 1993). El cuerpo tiene una capa muscular gruesa (Allen, 1992; Sisson *et al.*, 1993), con una luz estrecha que conecta la vagina con el útero (Allen, 1992). Dorsalmente, no existen líneas de demarcación entre el útero y la vagina, pero el cuello uterino es mucho más grueso que la vagina (Sisson *et al.*, 1993).

1.2.1.4. Cérvix

Es el órgano que separa al útero de la vagina, evitando el contacto del lumen uterino con el exterior, a excepción del momento del parto y del período de estro. El conducto cervical en la perra se caracteriza porque es vertical, con la abertura uterina dorsal y la abertura vaginal en posición ventral. El cérvix está formado por una capa circular de fibras musculares elásticas y una mucosa formada por un epitelio que contiene células productoras de moco (Esquivel, 2002).

1.2.1.5. Vagina

Es un órgano largo y estrecho, que sirve para la cópula, se encuentra situada entre el cérvix y el vestíbulo vaginal (Esquivel, 2002). Se dirige cranealmente desde la unión vestíbulo-vaginal hasta el cuello uterino, a la altura de la 4ª ó 5ª vértebra lumbar (Allen, 1992).

La vagina está formada por una capa serosa, una capa muscular formada por fibras musculares gruesas y una mucosa con pliegues longitudinales y

pequeños pliegues transversales, que facilitan el aumento de su diámetro y longitud (Allen, 1992; Esquivel, 2002; Sisson *et al.*, 1993).

Está cubierta por epitelio estratificado que es influenciado por cambios hormonales (Allen, 1992).

1.2.1.6. Vestíbulo vaginal

El vestíbulo vaginal conecta la vagina y la entrada de la uretra con la abertura genital externa (Allen, 1992; Sisson *et al.*, 1993). En la unión vestibulo-vaginal es importante la presencia de una estructura conocida como *cingulum*, la cual, constituye un problema para explorar la vagina, ya que es muy estrecha cuando la perra no está en estro (Esquivel, 2002). La luz vestibular asciende en un ángulo de 60°, y posteriormente recorre una distancia corta hacia delante en la pelvis hasta su unión con la vagina (Allen, 1992).

En el piso vestibular se encuentran los bulbos vestibulares, que son masas de tejido eréctil relativamente grandes (homólogos al bulbo peneano del macho), y están, comúnmente, unidos centralmente por una especie de istmo (Esquivel, 2002; Sisson *et al.*, 1993). Son considerados músculos circulares estriados que conectan el vestíbulo y la vulva (Sisson *et al.*, 1993).

Sobre la pared ventral, en posición craneal a la comisura vulvar ventral se encuentra el clítoris suspendido en un pliegue transversal de la mucosa (Allen, 1992).

1.2.2. Genitales externos

1.2.2.1. Vulva

Es la abertura del aparato genital femenino (Allen, 1992). La vulva tiene dos labios gruesos que forman una comisura ventral puntiaguda, la mucosa que la recubre es lisa y de color rojo (Allen, 1992; Sisson *et al.*, 1993). Está situada en posición ventral al suelo de la pelvis, su tamaño depende de la raza y de la fase del ciclo estral en la que se encuentre la hembra (Allen, 1992).

1.2.2.2. Clítoris

Es el homólogo del pene en la hembra, es pequeño, ancho y plano, tiene unos 3 a 4 cm de longitud en un animal de tamaño medio (Esquivel, 2002; Sisson *et al.*, 1993). Está situado sobre la pared ventral del vestíbulo, en posición craneal a la comisura vulvar ventral suspendido en un pliegue transversal de la mucosa (Allen, 1992).

Está formado por el cuerpo y el glande. El cuerpo del clítoris no tiene estructuras eréctiles, está infiltrado de grasa, y su contenido es arterias grandes y numerosos nervios en su parte ventral. El glande está compuesto por tejido eréctil y está situado en una gran fosa. Un pliegue de mucosa se extiende caudalmente sobre el glande y la fosa (Esquivel, 2002; Sisson *et al.*, 1993).

1.2.2.3. Uretra femenina

La uretra es grande, situada en el suelo de la pelvis y la vagina, está marcada sobre el suelo de la vagina, por un engrosamiento longitudinal que alcanza el vestíbulo (Sisson *et al.*, 1993).

1.2.2.4. Glándulas mamarias

Son normalmente diez y están dispuestas en dos series, que se extienden desde la parte caudal de la región pectoral hasta la región inguinal y se designan, según su localización, como torácicas (4), abdominales (4), e inguinales (2). Los pezones (*papilla mammae*) son cortos y sus vértices presentan de 6 a 12 orificios pequeños, llamado conductos excretores (Sisson *et al.*, 1993).

II. ENDOCRINOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

2.1. Hormonas Hipotalámicas

2.1.1. 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).

2.2. Hormonas Hipofisarias

2.2.1. 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).

2.2.2. 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 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 (Daval, 2001).

2.2.3. 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).

2.3. Hormonas foliculares

2.3.1. 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

2.3.2. 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).

2.3.3. 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)

2.3.4. 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 (Daval, 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).

2.3.5. 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)

III. FISIOLÓGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

3.1. 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).

3.1.1. 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 *espermatocitos*. Los *espermatocitos* 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 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).

3.1.2. 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.

3.1.3. 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 (Daval, 2001).

3.1.4. Erección

La erección es un acontecimiento psicossomático 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).

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

3.2. Fisiología de la Reproducción de la Hembra

La perra se clasifica como un animal monoéstrico que presenta de uno a tres ciclos estrales en un año. La ovulación se presenta 24 a 48 horas después del inicio de la etapa del estro liberando el o los óvulos en fase de ovocito primario el cual alcanza su madurez aproximadamente 108 horas después de la ovulación.

Finalmente la duración de la fase lútea del ciclo estral de la perra no gestante (diestro) es muy similar a la fase lútea de la perra gestante (Davol, 2001; Esquivel, 2002).

3.2.1. Ovogénesis

La perra tiene dos ovarios que producirán los óvulos. En los ovarios, los óvulos se encuentran dentro de folículos que crecen hacia la superficie del ovario. Cuando FSH y LH empiezan a ser secretadas en cantidades altas durante el inicio de la madurez sexual, los ovarios y los folículos dentro de ellos empezarán a crecer. Dentro de estos folículos, se secreta la hormona llamada estrógeno. Esta hormona es un químico biológico que produce cambios fisiológicos y sociales en la perra, que señalará el deseo de aparearse (Davol, 2000).

La perra ovula liberando un óvulo en un estado de inmadurez conocido como ovocito primario de tal manera que la segunda meiosis concluye después de la ovulación en el segmento distal del oviducto. En estudios *in vitro* se ha visto que el espermatozoide del perro es capaz de penetrar ovocitos inmaduros y formar el pronúcleo masculino, sin embargo, el término fertilización se refiere a la fusión del pronúcleo femenino con el masculino, situación que se presenta hasta la maduración del ovocito. El tiempo exacto de la maduración del ovocito no ha sido determinado aún, sin embargo, algunos estudios sugieren que este fenómeno puede ocurrir desde 2 hasta 6 días después de la ovulación. (Morton, 1986; Allen, 1992; Hutchison, 2001; Esquivel, 2002).

3.2.2. Fisiología del ciclo estral

La fisiología reproductiva de la perra es compleja, lo que ha provocado que los propietarios o los médicos veterinarios se confundan al recomendar el momento preciso para la cruce ya que existe gran variabilidad en la duración de las etapas del ciclo estral, un ejemplo clásico es el hecho de cruzar a la perra después del día 9 o cuando el sangrado desaparece, lo que da como resultado un margen de error muy alto (Allen, 1992; Davol, 2000; Hutchison, 2001;

Esquivel, 2002).

Antes de la madurez sexual de la perra, se secretan hormonas gonadotrópicas en cantidades muy pequeñas y por consiguiente, los ovarios permanecen inactivos. Sin embargo, alrededor de la edad de 6 meses, la hipófisis empieza a secretar los niveles más altos de las hormonas gonadotrópicas llamadas Hormona Folículo Estimulante (FSH) y hormona luteal (LH). La elevación de FSH y LH en la perra darán inicio al ciclo sexual (Davol, 2000). La edad a la que las perras alcanzan la pubertad es muy variable. La raza es un factor determinante para la presentación del primer estro. Generalmente las perras tienen su primer celo algunos meses después de alcanzar su peso y tamaño adulto, lo que ocurre entre los 6 y 10 meses de edad en las razas pequeñas y entre los 18 y 24 meses en las razas grandes (Davol, 2000; Esquivel, 2002).

Los aumentos cíclicos y disminuciones en FSH y LH, a su vez, controlan los cambios ováricos cíclicos, lo cual, es responsable de los eventos fisiológicos en el ciclo reproductor normal de la perra (Allen, 1992; Davol, 2000; Ruckebusch *et al.*, 1991).

El ciclo estral de la perra presenta ciertas particularidades a diferencia del ciclo de otras especies domésticas, por lo tanto el conocimiento de las características reproductivas de esta especie es muy importante para optimizar la producción de cachorros (Esquivel, 2002).

La historia de ciclos estrales anteriores de una perra, ayudará a conocer sus variaciones normales (Purswell y Parker, 2000), aunque el momento de la ovulación puede no ser constante durante los celos sucesivos en la misma perra (Allen, 1992).

La perra ha sido clasificada como una hembra monoéstrica ya que presenta un periodo de aceptación sexual en la época reproductiva y en promedio presenta dos celos al año con un intervalo de 6 meses aproximadamente pudiendo variar de 4 hasta 12 meses dependiendo de la raza (Davol, 2001; Esquivel, 2002).

Ruckebusch (1991), clasifica el ciclo estral en dos fases:

- a) *Fase folicular*: que incluye el proestro y el estro.
- b) *Fase lútea*: que comprende el metaestro y el diestro.

El ciclo reproductivo normal de la perra comprende las cuatro fases: proestro, estro, diestro, y anestro (Davol, 2000), aunque hay autores que consideran una fase de metaestro (Foster y Smith, 2001), como lo cita Ruckebusch (1991).

3.2.2.1. Etapas del ciclo estral

a) Proestro

También conocido como la fase folicular (Davol, 2000). Se considera como el inicio del ciclo estral (Esquivel, 2002). En el ciclo normal de la hembra canina, el proestro tiene una duración de 7 a 9 días (Foster y Smith, 2001; Allen, 1992), aunque hay quien sostiene que normalmente dura de 2 a 21 días (Stornelli *et al.*, 2001; Esquivel, 2002; Purswell y Parker, 2000), y quien afirma que tiene una duración media de 9 días con un rango de 3 a 17 días (Davol, 2000), por lo que se exige flexibilidad para acomodar estas grandes variaciones.

El principio de la fase del proestro lo indican, la inflamación de la vulva, el tejido externo de la apertura vaginal, y las marcas de la descarga sanguinolenta (Allen, 1992; Davol, 2000; Foster y Smith, 2001), resultado de una diapedéisis y de una ruptura capilar subepitelial del endometrio (Esquivel, 2002). La descarga sanguinolenta puede no verse en algunas perras porque la eliminan lamiéndose, también es difícil de identificarla en hembras de pelo largo, y en perras de color negro no se aprecia (Allen, 1992; Esquivel, 2002). La presentación del proestro se puede predecir en algunas perras por cambios en su pelaje (Allen, 1992).

En algunos casos la vulva puede inflamarse varios días antes del inicio de la descarga sanguinolenta, y es posible también que las perras atraigan a perros varias semanas antes del inicio de ésta descarga (Purswell y Parker, 2000), ya que los perros pueden detectar las feromonas asociadas con elevaciones de estrógeno antes del inicio del proestro clínicamente aparente (Purswell y Parker,

2000; Foster y Smith, 2001). La emisión de orina en el proestro es más frecuente (cantidades pequeñas) para diseminar las feromonas, la perra resulta atrayente para los machos aunque generalmente no permitirá la monta (Allen, 1992; Esquivel, 2002).

En esta etapa hay crecimiento folicular, la Hormona Folículo Estimulante (FSH), es la responsable, bajo su influencia el folículo en desarrollo empieza a secretar estrógenos (Esquivel, 2002). Las cantidades crecientes de estrógenos, secretadas por los folículos ováricos, causan que las células de las paredes vaginales tomen una forma distintiva, éste es un proceso conocido como cornificación (Davol, 2000). Las concentraciones de estrógenos en suero son bastante altas durante dos meses antes del inicio de la descarga sanguinolenta (Purswell y Parker, 2000).

Ambos el nivel de estrógenos y la cornificación vaginal son indicadores útiles de proestro (Davol, 2000).

b) Estro

La palabra estro deriva del griego *oistros* que significa deseo manifiesto (Esquivel, 2002). Tiene una duración media de 9 días (Allen, 1992; Davol, 2000), con un rango de 3 a 21 días (Davol, 2000; Esquivel, 2002), por lo tanto resulta difícil establecer un patrón estándar para todas las perras. La receptividad a la monta (apareamiento) marca el principio de la fase del estro (Allen, 1992; Davol, 2000; Esquivel, 2002; Purswell y Parker, 2000), y éste finaliza cuando la perra rechaza la monta (Allen, 1992; Esquivel, 2002). En promedio, las perras aceptarán al macho en los días 9 ó 10 y dejarán de aceptarlo en los días 16 ó 17, considerándose que día 1 se refiere al primer día de descarga sanguinolenta (Purswell y Parker, 2000).

Los signos clínicos, además de que la hembra se torna receptiva al macho, son cambios de comportamiento, contrae la región perineal al contacto con el macho y se queda quieta apoyándose en sus extremidades para facilitar la penetración. También existen algunos signos físicos, la vulva se torna flácida, la secreción vaginal puede continuar (Esquivel, 2002). El flujo puede ser menos

copioso y menos hemorrágico que en el proestro, aunque este no es un hecho constante, es decir algunas perras presentan un flujo escaso durante el proestro y estro, mientras que otras tienen un flujo sanguinolento abundante que persiste en esta etapa (Allen, 1992).

Fisiológicamente, el estro coincide con la presencia predominante de las células cornificadas epiteliales vaginales, con un aumento en el nivel de progesterona sérica a 2 ng./ml. (Davol, 2000), y con una disminución en los niveles de estrógenos (Esquivel, 2002).

Para realizar la cruce por monta natural es mejor llevar la perra al lugar donde se encuentra el perro debido a consideraciones territoriales. Las perras se sentirán menos dominantes fuera de su territorio de casa, y los perros deben ser más dominantes que las perras para que las perras permitan la cópula. Perras dominantes (alfa) no permitirán la cópula de perros menos dominantes (beta) (Purswell y Parker, 2000).

Una vez que ha iniciado la conducta de caballete (aceptar al macho) la cruce debe ocurrir cada dos o tres días hasta que la perra ya no acepte al perro (Purswell y Parker, 2000). Sólo durante los 3 a 7 días del estro la perra estará en la fase apropiada para quedar preñada (Foster y Smith, 2001). Tradicionalmente, las perras eran cruzadas el 14^{avo} día después del inicio del proestro. Esto porque fue observado que la mayoría de las perras exhibía "señales con la cola" (desviación lateral de la cola con elevación de la vulva). Después, cuando se adoptó la norma para realizar uniones múltiples, la perra se apareaba en los días 12 y 14 (para el servicio doble), o en los días 11, 13, y 15 (para el servicio triple) (Davol, 2000).

Aunque éstas reglas son adecuadas para asegurar una cruce óptima y tamaño de camada en la perra promedio, no todas las perras ovulan el día 12 de inicio del proestro. Algunas pueden ovular en el día 5 o tan tarde como el día 25, en tal caso utilizando esta regla resultará un fracaso el momento de apareamiento (Allen, 1992; Davol, 2000).

c) Metaestro

Para muchos autores ésta etapa del ciclo estral no está considerada en la hembra canina, pero Foster y Smith (2001) afirman que después de 3 a 7 días de estro, la perra pasa a la etapa de metaestro, que no prolonga la fertilidad, y no aceptará al macho. Sin embargo Allen (1992), considera al metaestro y al diestro como una misma etapa, la cual abarca la mayor parte de la fase luteínica de la perra. Esta etapa comienza cuando la perra rechaza la monta por primera vez; la vulva aparece gradualmente menos tumefacta y puede desarrollarse un flujo vulvar mucoide como en la gestación; su duración es de 60 días y termina cuando las concentraciones de progesterona circulante son mínimas (Allen, 1992).

Por otro lado, mientras los términos metaestro y diestro han sido utilizados para referirse a la fase lútea del ciclo desde el punto de vista clínico tenemos lo siguiente:

- *Metaestro* se refiere al período de luteinización temprana de los folículos, que en el caso de la perra se presenta durante la fase final del proestro.
- *Diestro* se refiere al período del funcionamiento del cuerpo lúteo.

En base a lo anterior no se habla de un metaestro en la perra ya que los eventos característicos del metaestro (fase lútea) se presentan mientras la perra sigue en estro (antes de la ovulación), por lo tanto en la perra, sólo se le considera al diestro como la etapa de influencia progestacional ya que el metaestro se superpone con el estro (Esquivel, 2002).

d) Diestro

Tiene una duración media de 2 meses (Davol, 2000), pero hay quien sostiene que en la hembra que no está preñada su duración promedio es de 100 días (Esquivel, 2002). Aproximadamente 6 días después de la ovulación, las células epiteliales cornificadas vaginales se revertirán a un estado no cornificado. Esta condición marca el principio del diestro (Davol, 2000). También se puede

considerar que comienza el primer día en que la perra no acepta al macho (Esquivel, 2002).

Dentro de los signos clínicos del diestro figuran:

- La hembra rechaza la monta del macho.
- La hembra ya no atrae a los machos.
- La vulva regresa a su tamaño normal (tamaño anebral), desapareciendo la flacidez y la secreción (Esquivel, 2002).

Después de la ovulación, continúa el desarrollo del cuerpo lúteo dentro de las cavidades foliculares y por lo tanto, la concentración de progesterona sigue elevándose, alcanzando su pico 20 a 30 días postovulación o bien 2 a 3 semanas después del inicio del diestro y se mantiene en una concentración de 15 a 60 ng./ml. aproximadamente, por 1 ó 2 semanas (Esquivel, 2002). Tanto en las perras gestantes como en las no gestantes, los niveles de progesterona son muy similares en esta fase. El diestro termina cuando el nivel de progesterona decae a menos de 1 ng./ml. (Davol, 2000). Esto sucede a los 63 días en las hembras preñadas para la presentación del parto, y a los 100 días en las hembras no gestantes (Esquivel, 2002), aunque Davol (2000), afirma que en las hembras no gestantes los niveles de progesterona disminuyen aproximadamente dos meses después de la ovulación.

e) Anestro

El anestro se define como el tiempo que transcurre entre el final de la fase lútea (diestro en perras vacías ó gestación en perras gestantes), y el principio de la fase folicular (proestro) (Esquivel, 2002), es decir, el principio de esta fase es marcado por el descenso del nivel de progesterona sérica a menos de 1 ng./ml., y la aparición del sangrado preestral indica el final de esta fase (Davol, 2000).

El inicio del anestro en perras que no quedaron gestantes es difícil de detectar, ya que no existe un cambio claro entre la finalización del diestro y el inicio del anestro, es decir, no hay diferencia clínica entre la perra diéstrica y la

perra anéstrica (presentan los mismos signos). En cambio en las perras gestantes es evidente que el parto marca la demarcación entre gestación (diestro) y el inicio del anestro (Esquivel, 2002).

El anestro constituye un período de inactividad ovárica (Allen, 1992; Esquivel, 2002). Tiene una duración media de 4 a 4.5 meses (Allen, 1992; Davol, 2000), pero hay citas de que dura de 4 a 7 meses si la perra cicla dos veces al año, y de 9 a 11 meses si cicla una sola vez (Esquivel, 2002).

Esta duración puede variar de 1 mes a 2 años, ya que se ve influenciada según Allen (1992) por:

- *Época del año*: algunas perras tienen la tendencia primitiva de un período de proestro/estro por año, por ejemplo la raza Basenji; mientras que en otras razas muchas hembras pueden iniciar la fase proestro/estro durante la primavera con preferencia a otra épocas del año.
- *Feromonas*: las perras que se mantienen juntas suelen mostrar la fase proestro/estro en la misma época; se cree que los olores de una perra en fase de estro pueden estimular a otras.
- *Factores desconocidos*: sigue siendo un misterio la señal que pone en marcha el desarrollo folicular en la mayoría de las perras.

Durante el anestro ocurre la involución uterina postparto o bien la preparación del útero para el siguiente ciclo (Esquivel, 2002).

IV. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE ESTRO

En términos endocrinos, el período fértil (estro), se ha definido cuando los estrógenos disminuyen, la progesterona aumente y el Pico de LH aparece lo que resulta difícil de detectar, dando como resultado la constante confusión de creer que la fertilidad inicia cuando la perra acepta la monta, que no siempre ocurre. Por lo tanto, se deben implementar otras alternativas como la citología vaginal exfoliativa o la vaginoscopía para detectar el momento óptimo para realizar la cruce o la Inseminación Artificial (Esquivel, 2002).

4.1. Citología Vaginal

Es una técnica utilizada para determinar en que etapa del ciclo estral se encuentra la perra y principalmente el momento más adecuado para realizar la monta natural o la Inseminación Artificial. La ovulación ocurre al inicio del estro y por lo tanto, es importante identificar esta etapa. También ayuda a detectar patologías del aparato reproductor femenino (Hutchison, 2001; Esquivel, 2002).

4.1.1. Fundamento de la citología vaginal exfoliativa

El principio de la citología vaginal exfoliativa se basa en identificar el tipo y cantidad de células de las diferentes etapas del ciclo estral, ya que los cambios hormonales que sufre la vagina durante el ciclo se reflejan en la morfología de sus células epiteliales. Al inicio del ciclo, la célula epitelial recibe una mayor irrigación sanguínea (nutrición celular). Conforme los niveles de estrógenos se incrementan el epitelio vaginal se va engrosando ocasionando que la célula epitelial se vaya separando del aporte sanguíneo, dando como resultado una transformación celular que va de célula parabasal a célula anucleada o escama (Esquivel, 2002). Los practicantes de la citología vaginal deben entender por que ocurren los cambios citológicos y lo que indican estos cambios (Purswell y Parker, 2000).

4.1.2. Clasificación de las células vaginales

En cuanto al tipo de células vaginales estas se clasifican según Esquivel (2002), en:

- a) *Célula parabasal*: Es una célula grande de forma oval o redonda con núcleo aparente y pequeña cantidad de citoplasma. Esta célula se desprende de la capa de células germinales cercana a los vasos sanguíneos y predomina en el anestro y principios del proestro.
- b) *Célula intermedia*: Es una célula grande de bordes irregulares con núcleo más pequeño o más grande que la parabasal pero con mayor cantidad de citoplasma. La presencia de esta célula indica la etapa anterior a su transformación a superficial, predomina a la mitad del proestro.
- c) *Célula superficial*: es una célula pequeña, de bordes angulosos, con núcleo de menor tamaño que las anteriores. Es característica del final del proestro y todo el estro, que es cuando la vagina se encuentra bajo la influencia del pico estrogénico.
- d) *Célula anucleada*: También se le conoce como escama, es una célula pequeña, sin núcleo, de bordes angulosos e irregulares que predomina en el estro y marca el final del proceso de descamación de la célula parabasal.

4.1.3. Tipos de células presentes en cada fase del ciclo estral

4.1.3.1. Proestro

Debido a la elevación de la estrogenemia en el proestro, el número de capas celulares del epitelio vaginal aumenta. Este hecho hace que las células luminales se alejen de la irrigación sanguínea evolucionando hacia la muerte. Este fenómeno podrá visualizarse claramente en los extendidos vaginales en los cuales aumentará el porcentaje de células superficiales (cornificadas) a medida que se acerca el fin del proestro y el comienzo del estro (Jhonston *et al.*, 2001).

4.1.3.2. Estro

Bajo la influencia de estrógeno, el epitelio vaginal engruesa de 20 a 40 capas de células. Este espesor protege la vagina durante la cópula. Cuando el epitelio vaginal espesa, la citología vaginal exfoliativa muestra el cambio de células no cornificadas a células cornificadas del epitelio. Cuando las células cornificadas del epitelio predominan, la perra o está en proestro (Purswell y Parker, 2000), o estro (Davol, 2000; Purswell y Parker, 2000).

El epitelio vaginal que ha aumentado de grosor bloquea la migración de neutrófilos al lumen vaginal. Raramente, una perra normal presenta neutrófilos en citología vaginal durante el estro (Purswell y Parker, 2000).

4.1.3.3. Diestro

El valor de la citología vaginal se sobrestima a menudo en el manejo reproductivo, pero hay un hallazgo absoluto en citología vaginal que indica el inicio del diestro. La citología vaginal cambia abruptamente y dramáticamente durante 24 a 48 horas de un predominantemente modelo de células cornificadas a un modelo de células no cornificadas. Los neutrófilos están presentes en números grandes. El primer día de este cambio citológico dramático es llamado día 1 del Diestro o D1. Esta información es valiosa porque puede usarse para predecir la duración de la gestación. Las perras paren 56 o 57 días típicamente después del inicio del diestro citológico (Purswell y Parker, 2000).

4.1.4. Técnica de citología vaginal exfoliativa

Para tomar una muestra de citología vaginal se introduce un hisopo estéril por la comisura dorsal de los labios vulvares (previa limpieza de estos). Se debe hacer suavemente hasta atravesar el cingulum (unión vestíbulo - vaginal) para llegar a la porción caudal de la vagina, en la cual, mediante movimientos rotatorios del hisopo, se colectará el material celular. Hecho esto, se retira el hisopo y se hace un frotis por rodamiento sobre un cubreobjetos, se fija en alcohol al 95 % durante 5 a 10 minutos y se tiñe para observarla al microscopio. Existen técnicas

de tinción como la de Papanicolau, Diff-quick, Giemsa, Wright y Shorr que pueden ser utilizadas para teñir muestras de citología vaginal, de las cuales la técnica de Shorr se describe a continuación (Esquivel, 2002) :

- 1.- Se lava el exceso del fijador con agua corriente.
- 2.- Hematoxilina de Harris por 30 seg.
- 3.- Enjuague con agua corriente por 5 minutos.
- 4.- Colorante de Shorr por 1 minuto.
- 5.- Enjuague con agua corriente.
- 6.- Alcohol al 70 % por 30 seg.
- 7.- Alcohol al 95 % por 30 seg.
- 8.- Alcohol absoluto por 30 seg.
- 9.- Xilol por 1 minuto.

4.2. Vaginoscopía

La vaginoscopía es un diagnóstico más preciso para el manejo reproductivo en perras que la citología vaginal. Bajo la influencia del estrógeno, los pliegues vaginales se inflan, humedecen, y ruborizan. Conforme avanza del proestro al estro, estos pliegues empiezan a perder su apariencia hinchada y se arrugan. Cuando la perra esta por completo en estro, los pliegues vaginales tienen arrugas pronunciadas con bordes bien definidos. Conforme la perra avanza del estro al diestro, los pliegues vaginales se aplanan, y la mucosa vaginal asume una apariencia rayada roja y blanca. La vaginoscopía es fácil de hacer y puede hacerse en una perra despierta, sin tranquilizarla. Pueden usarse Proctoscopios o endoscopios, flexibles o rígidos. El calibre debe ser de 8 a 15 mm de diámetro y por lo menos 10 a 20 cm de longitud con una fuente de luz adecuada. Usted puede usar la vaginoscopía con o en lugar de la citología vaginal (Purswell y Parker, 2000).

Normalmente, el epitelio vaginal son sólo unas capas gruesas de células y es susceptible a lesión, incluso por el toque más ligero. Esto está demostrado por el hecho de que las hemorragias petequiales son comunes cuando se han

realizado vaginoscopías, aún cuando la perra no se encuentra en proestro ó estro (Purswell y Parker, 2000).

V. DETECCIÓN DE LA OVULACIÓN

La ovulación es el proceso mediante el cual el folículo alcanza la superficie del ovario y se rompe, liberando un óvulo (Davol, 2000). La perra es única cuando se compara a otros animales domésticos ya que ovula estando presente progesterona en su organismo, contrario a otras especies que requieren de estrógenos para ovular (Hutchison, 2001; Esquivel, 2002). Además la perra ovula un huevo inmaduro que requiere una división meiótica extensa antes de que pueda ser fertilizado. Todo este proceso tiene lugar en un ciclo estral que promedia 21 días de los que el periodo fértil es de aproximadamente 72 horas (Morton, 1986; Allen, 1992; Hutchison, 2001).

5.1. Métodos de Diagnóstico de la ovulación

5.1.1. Señales fisiológicas.

La suavidad de la vulva y el color de la descarga vulvar han sido utilizados con frecuencia para determinar el tiempo apropiado para aparear una perra con éxito, ya que la suavidad de la vulva, indica el inicio de la ovulación (Davol, 2000; Hutchison, 2001). Utilizar la conducta receptiva de la hembra como un indicador de la ovulación, y determinar así el tiempo de apareamiento tiene muchas limitantes, porque estos signos no siempre son claros. Mientras algunas perras pueden presentar un proestro sin signos, (sin mostrar ninguna señal exterior de descarga sanguinolenta, etc.) lo cual dificulta el estimar la fecha exacta de ovulación, otras, por el contrario pueden ser receptivas a los machos a lo largo del proestro, o pueden permanecer involuntarias para el apareamiento incluso en el momento de la ovulación. Las diferencias observadas de perra a perra con respecto a señales y conducta de apareamiento, así como el hecho de que un error producirá 6 meses o más de espera para intentar de nuevo la reproducción

de los ejemplares, son motivos suficientes para utilizar otro método más eficaz para determinar el momento de la ovulación (Davol, 2000).

5.1.2. Monitoreo de estrógeno.

El uso de estrógeno para determinar el tiempo de ovulación de la perra no es fiable debido a la singularidad del proceso ovulatorio de la perra (Hutchison, 2001).

5.1.3. Pico de la Hormona Luteinizante (LH)

Dos días antes de la ovulación, hay una ola o pico en la secreción de la Hormona Luteinizante (LH) por parte de la hipófisis. Esta ola de LH es de importancia crítica porque en su ausencia, aunque sucedan otros efectos fisiológicos hormonales, la ovulación no ocurrirá (Davol, 2000), ya que la Hormona Luteinizante de la glándula pituitaria activa la liberación de los óvulos de los folículos (Hutchison, 2001), provocando la ovulación de 36 a 50 horas después de haber alcanzado su nivel más alto (Esquivel, 2002), aunque en la mayoría de las perras esto ocurre a las 48 horas después del pico de LH (Davol, 2000; Stornelli *et al.*, 2001).

Por lo tanto, la perra promedio experimentará la ola o pico de la Hormona Luteinizante (LH) en el Día 10 (donde Día 1 se define como el primer día de descarga sanguinolenta), ovulará en el Día 12, y por consiguiente, la concepción óptima es en el Día 14 (Stornelli *et al.*, 2001; Davol, 2000), es decir, si estimamos el día en que ocurre el pico preovulatorio de LH, dos días más tarde ocurrirá la ovulación de oocitos primarios, los cuales madurarán en aproximadamente 48 horas después de haber sido ovulados, para poder entonces ser fertilizados (Stornelli *et al.*, 2001).

Por otro lado, la ola de la Hormona Luteinizante (LH) causa en las células ováricas el cambio de secreción de hormona progesterona en lugar de estrógeno. Hay un aumento como resultado, en nivel de progesterona, y una disminución en niveles de estrógeno. Este fenómeno marca la transición de la fase folicular a la fase lútea y tiene una duración de 1 a 3 días (Davol, 2000; Esquivel, 2002).

5.1.3.1. Pruebas para la determinación de los niveles de Hormona Luteinizante

Al contrario de la concentración de progesterona que continúa aumentando, la LH alcanza su pico en un periodo de 12 a 24 horas (Davol, 2000; Hutchison, 2001), y después disminuye rápidamente. Por lo que, aún haciendo pruebas diarias, es posible pasar por alto la ola de LH (Davol, 2000).

5.1.3.1.1. Prueba de orina

La prueba de orina para determinar los niveles de LH es infructuosa debido a la necesidad de coleccionar la primera orina de la mañana de la perra y al hecho de que LH se metaboliza en fragmentos diferentes, algunos son perceptibles en la orina por pruebas comerciales, mientras otros no (Hutchison, 2001).

5.1.3.1.2. Prueba en suero

Se ha utilizado con éxito la prueba en suero para determinar los niveles de LH, para el diagnóstico de la ovulación. Pero la corta duración de la Hormona Luteinizante (LH) en el torrente sanguíneo, requiere que la prueba se practique diariamente, en lo que se pierde tiempo y puede ser incómodo para el paciente (Davol, 2000; Hutchison, 2001).

5.1.4. Aumento de Progesterona.

Al final de la fase de proestro, el nivel de Hormona Luteinizante (LH) aumentará. Esta ola de LH coincide con un aumento en el nivel de progesterona (Davol, 2000). Por consiguiente, la descarga de progesterona por parte del ovario y su elevación subsecuente a un promedio de 2 a 3 ng./ml. señala la liberación de Hormona Luteinizante (LH) de la glándula pituitaria, y denotan el inicio del proceso ovulatorio. La elevación de progesterona a más de 5 ng./ml. (5 a 8 ng./ml.) indica que la ovulación ha ocurrido (Hutchison, 2001).

La ovulación normalmente ocurre 2 días después del aumento de los niveles de progesterona, es por eso que supervisar los niveles de progesterona es

un indicador excelente para determinar el momento exacto para realizar la Inseminación Artificial (IA) (Davol, 2000).

La prueba de ELISA para determinar los niveles de progesterona, es un predictor exacto para la ovulación. Para realizar esta prueba, se recomienda que se examinen frotis vaginales periódicamente al inicio del proestro para supervisar las células epiteliales vaginales cornificadas que están presentes como resultado del incremento del estrógeno. Cuando las células de la pared vaginal son aproximadamente 60% cornificadas, la prueba de progesterona en suero con ELISA debe realizarse (Davol, 2000). Las muestras son tomadas idealmente todos los días, (aunque cada 2 días también pueden ser utilizadas), y pueden ser de sangre entera o suero (dependiendo del equipo de la prueba a utilizar) (Davol, 2000; Hutchison, 2001). Se agrega la muestra a un indicador de la prueba que se ha tratado con anticuerpos monoclonales específicos para progesterona, y se determinan los resultados. Sin embargo, las limitaciones a la sensibilidad de la prueba ELISA a veces pueden producir resultados falso-positivos y falso-negativos. Esto es porque la prueba no es exacta para determinar los niveles de progesterona sérica en el rango de 1.5 a 3.0 ng./ml., y este es el rango de concentración de importancia para determinar la ola de LH. La prueba de ELISA tiene mayor exactitud en el rango de más de 5.0 ng./ml. Por lo tanto se corre el riesgo de que una prueba indique un nivel "promedio" de progesterona (y pensemos en la ola de LH), pero puede indicar un nivel "bajo" de progesterona cuando se toma el próximo día. Esto sugiere que la prueba anterior es un falso-positivo porque una vez que el nivel de progesterona aumenta, debe permanecer elevado y seguir aumentando a lo largo de la ovulación, por consiguiente, para reducir el error debido a falsos-positivos, se debe realizar la prueba dos días consecutivos para su comprobación, antes de establecer el momento de la cruce o de la Inseminación Artificial (Davol, 2000).

La liberación de cortisol debe ser considerada cuando se hacen pruebas de progesterona en perras estresadas, ya que pueden tener un periodo prolongado entre un aumento de 2 a 3 ng./ml. y el tiempo que la progesterona sube a más de 5 ng./ml. (Hutchison, 2001).

5.1.5. Citología vaginal

La citología vaginal no es exacta para determinar el inicio de la ovulación o el tiempo óptimo de apareamiento (Purswell y Parker, 2000).

VI. HISTORIA DE LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

6.1. Origen de la Inseminación Artificial (IA)

Es difícil fundamentar que los veterinarios establecieron la Inseminación Artificial (IA), pues son varios los antecedentes de la IA que se pueden citar, y no precisamente de veterinarios. Ya los árabes parecen haber usado la IA en equinos en el siglo XIV (Pérez, 2001). Spallanzani en Italia en 1780 usó semen canino fresco para inseminar una perra en estro directamente en el útero (Pérez, 2001; Farstad, 2000). Ya en 1776 Spallanzani había observado que las bajas temperaturas provocaban una reducción reversible de la actividad metabólica de los espermatozoides, lo cual permitía almacenarlos (Stornelli *et al.*, 2001).

Joan Hunter fertilizó exitosamente a una mujer en 1799 por medio de la IA. E. Ivanov condujo exitosamente sus estudios hasta perfeccionar en Rusia a partir de 1899 la técnica de IA aplicándola tanto a equinos como a vacunos y ovinos (Pérez, 2001). En 1956 Harrop logra la primer preñez con semen refrigerado abriendo las puertas a la criopreservación. Posteriormente, en 1969, se comunica por primera vez una IA satisfactoria con semen congelado (Stornelli *et al.*, 2001).

6.2. Historia de la Inseminación Artificial en Caninos

Aunque el campo es relativamente nuevo en reproducción canina, ha sido practicado con éxito en ganado y otras especies durante muchas décadas (Foster y Smith, 2001). Los estudios sobre semen canino se iniciaron con la invención del microscopio óptico por Leeuwenhoek en 1678 (Esquivel, 2002). Sin embargo, las tecnologías de asistencia reproductiva en perros comenzaron en el siglo

XVIII (Farstad, 2000), reportándose que la primera Inseminación Artificial científicamente registrada se realizó en 1779 en Italia por Lázaro Spallanzani, que llevó al nacimiento de tres cachorros, dos machos y una hembra (Esquivel, 2002; Pérez, 2001; Farstad, 2000).

En 1782, Rossi repitió este experimento obteniendo buenos resultados, ya que la perra que inseminó parió 4 cachorros después de 62 días de gestación. No hubo más referencias sobre Inseminación Artificial (IA) de perras hasta 1884, cuando una serie de experimentos fueron realizados por Sir Everett Millais, quien para comprobar que la IA era factible cruzó diferentes razas como el Basset Hound y el Blood Hound, las cuales de manera natural no se aparean. En 1914, Amantea empezó a utilizar la primer vagina artificial para colectar semen de perro, observando además que el semen canino es eyaculado en 3 porciones bien diferenciadas (Esquivel, 2002).

Aunque se cuenta con la investigación y experiencia desarrollados en la práctica bovina, no se ha logrado su proporción de éxito en caninos (Foster y Smith, 2001). El progreso en esta área se desarrolló lentamente, el subsecuente desarrollo incluyó al equipo de IA y métodos para la preservación a corto plazo de semen fresco, y más tarde para semen congelado, que condujo a la primera camada del mundo producida de semen congelado en 1969 (Stornelli *et al.*, 2001; Farstad, 2000). En el período comprendido entre 1971 y 1977, nacieron aproximadamente 800 cachorros concebidos mediante IA, con semen congelado. El American Kennel Club (AKC) desde 1981 aprobó el registro de camadas obtenidas mediante Inseminación Artificial con semen congelado, sucediendo eventos similares en otras partes del mundo (Esquivel, 2002).

El margen de error muchas de las veces no se debe a la técnica, sino la inestabilidad relativa del semen canino cuando se congela o refrigera (Foster y Smith, 2001), pero la mejora de métodos de congelado y de equipo de IA de 1970 dió a la IA utilidad como una técnica de reproducción para perros (Farstad, 2000).

En paralelo, la IA en zorros se desarrolló en Escandinava a principios de 1980; esto produjo la valiosa cruce de zorros plateados y zorros azules para la producción de pieles (Farstad, 2000).

Además, en el ganado, la regularidad y competencia de la fisiología reproductiva de la hembra se ha seleccionado de forma consistente para la reproducción, mientras que no es el caso en perros. El ejemplar que no tiene un ciclo estral predecible o altos niveles de fertilidad se elimina del hato. Mientras que en caninos, los criadores son más atados emocionalmente a sus animales y muchas veces intentan reproducir perras problema y con ciclos irregulares, manteniendo así características genéticas indeseables (Foster y Smith, 2001).

En los últimos años, las técnicas de Inseminación Artificial en caninos se han aplicado con éxito en investigación básica para estudiar la maduración del oocito, en fertilización en vitro, criopreservación de embriones y transferencia de embriones en caninos (Farstad, 2000).

Los laboratorios que proporcionan pruebas cuantitativas radioinmunes el mismo día o al día siguiente proporcionarán información más exacta que los equipos de ELISA. Con estos adelantos en manejo reproductivo canino, el uso exitoso de semen refrigerado y congelado se está volviendo rutinario en perros (Purswell y Parker, 2000).

Desgraciadamente, debido a la fisiología particular de la hembra canina, los progresos en las técnicas de reproducción artificiales se ha retrasado (Farstad, 2000). Además el éxito de la IA depende de el estado de salud y nutrición de los animales reproductores, así como el manejo del momento de inseminación, semen utilizado y técnica utilizada (Stornelli *et al.*, 2001).

La técnica actual y los métodos de Inseminación Artificial (IA) son relativamente fáciles y son realizados por muchos criadores y la mayoría de las clínicas veterinarias (Foster y Smith, 2001).

En la actualidad la IA se realiza con semen fresco, refrigerado o congelado, cada tipo de semen nos brindará distintas posibilidades de aplicación así como también exigirá un manejo de diferente complejidad (Brown, 1992; Stornelli *et al.*, 2001).

VII. INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN CANINOS

7.1. Objetivos de la Inseminación Artificial en Caninos

La Inseminación Artificial (IA), es una técnica que cada vez se utiliza más, y con el uso del semen refrigerado y/o congelado, abrirá un enorme campo de posibilidades especialmente para los criadores y Médicos Veterinarios dedicados a los caninos (Villalba, 1997).

Un macho excepcional, escogido por su inteligencia, personalidad o estructura puede continuar produciendo descendencia largo tiempo después de su muerte o puede aparearse con hembras de las que está separado por grandes distancias (Allen, 1992; Foster y Smith, 2001; Stornelli *et al.*, 2001). Además, preservando su semen podrá preñar muchas más hembras que físicamente a través de la monta natural (Foster y Smith, 2001; Stornelli *et al.*, 2001).

Esta técnica, si bien se practica tanto en perras como en gatas, está mucho más extendida en las primeras, siendo poco frecuente en las gatas debido quizás al menor valor económico de éstos y a que técnica resulta (Villalba, 1997).

A veces la Inseminación Artificial se utiliza aunque ambos perros están presentes. Esto normalmente ocurre cuando el perro o la perra tienen un problema reproductivo. O en casos en los que, el macho no monta o no muestra interés por la hembra, o la hembra no le permitirá al macho montarla (Allen, 1992; Davol, 2000; Esquivel, 2002). A menudo éstos simplemente son problemas de perros inexpertos. En perros salvajes, la reproducción tiene un componente sabio donde los machos más jóvenes aprenden la conducta sexual de manera interactiva y observando a los adultos. Separando a los cachorros de sus unidades familiares a las siete u ocho semanas de edad, nosotros hemos eliminado ésta parte del proceso de aprendizaje (Foster y Smith, 2001).

La IA es una técnica útil, de baja o mediana complejidad, de moderado costo, que brinda grandes posibilidades en la clínica reproductiva diaria y el desarrollo biotecnológico. Sin embargo, si no se tienen en cuenta algunos factores

sumamente importantes en su aplicación, puede tornarse una práctica desalentadora (Stornelli *et al.*, 2001).

7.2. Causas de Uso de la Inseminación Artificial en Caninos

Las causas que pueden hacer necesaria la Inseminación Artificial (IA), son aquellas alteraciones que impiden la fecundación tanto en los machos como en las hembras (Villalba, 1997). El uso de Inseminación Artificial en caninos es una solución a varias situaciones que pueden impedir o pueden complicar la cruce natural. Tales situaciones incluyen impedimentos anatómicos, renuencia para engendrar (conducta dominante/agresiva de la perra o sumisión en el macho), debilidad o dolor de la columna o miembros posteriores (en machos geriátricos que todavía proporcionan servicio), reducir el riesgo de enfermedad sexualmente transmitida al macho (Brucelosis), o distancia geográfica entre el perro y la perra (Davol, 2000). También puede utilizarse en perros y perras que no se aparean por razones psicológicas, y en los animales sin experiencia sexual o muy jóvenes (Allen, 1992; Esquivel, 2002), y en casos donde la hembra está en la fase correcta de calor, pero ésta o el macho carecen del deseo natural de aparearse (Foster y Smith, 2001).

7.2.1. Causas de uso de la Inseminación Artificial en hembras

Comportamiento agresivo hacia el macho o conductas que imposibiliten la monta del macho. Malformaciones congénitas o adquiridas de vagina y/o vulva como: hiperplasia vaginal, estrechez vulvar, vaginitis crónica, hímen persistente, cicatrices en vagina provocadas por parto distócico. Debilidad de las extremidades posteriores que no permiten soportar el peso del macho en la monta. Enfermedades como la artrosis o artritis con las mismas consecuencias (Esquivel, 2002; Villalba, 1997). Perras con enfermedad uterina u ovárica sospechosa, es decir, perras con historias de fracaso reproductor en las que el problema se puede resolver con una inseminación quirúrgica (Hutchison, 2001).

7.2.2. Causas de uso de la Inseminación Artificial en machos

Agresividad hacia la hembra, ausencia de líbido, afecciones o debilidad de las extremidades posteriores, traumatismos en el pene, eyaculación precoz, engrosamiento precoz de los bulbos cavernosos que impiden la penetración, exceso de peso (Villalba, 1997; Esquivel, 2002).

Si el macho al intentar montar ha sido agredido por la hembra o por su dueño, puede asociar una agresión o dolor con el trabajo sexual, por lo tanto, se anula o se afecta el buen desempeño de este animal y se utiliza la Inseminación Artificial (Esquivel, 2002). También se utiliza IA, en los casos en los que el macho tiene bajas proporciones de espermatozoides, ya que depositando el semen directamente en el útero, la concepción puede lograrse con menor número de espermatozoides y menos calidad de semen global (Hutchison, 2001). Hay también casos donde se han dañado machos valiosos y no pueden montar una hembra. Su genética está por supuesto inalterada y la IA le permite continuar contribuyendo a su raza (Foster y Smith, 2001).

7.3. Ventajas y Desventajas de la Inseminación Artificial en Caninos

Con IA, en una perra que tiene excelente calidad genética y tiene el potencial para construir un criadero de su descendencia, pero que no este en calor, se puede planear una cruce conveniente, recolectando el semen y preservarlo hasta que esté lista para ser preñada (Foster y Smith, 2001).

La práctica de la inseminación permite obtener camadas de animales que de otra forma hubiera sido imposible, permitiendo a los criadores la introducción de nuevas líneas de sangre con el uso de semen congelado, la disminución de enfermedades genéticas con el uso de sementales probados (Morton, 1986). Permite el cruzamiento de perros de diferentes países sin las limitaciones que impone la cuarentena (Allen, 1992).

Pero también se pueden difundir y transmitir múltiples problemas o alteraciones genéticas reproductivas indeseables. Por esta razón la Inseminación Artificial es una técnica que en las perras debe manejarse con criterios muy rígidos

en cuanto a la elección de los reproductores en los que se va a realizar (Villalba, 1997).

Actualmente, en muchas razas, numerosos individuos están mostrando fisiología reproductiva y conducta anormal. La fase de proestro se prolonga durante 3 a 5 semanas, los machos tienen la cuenta espermática anormal, el macho o la hembra nunca entra en verdadero estro, los números de camada disminuyen drásticamente, las madres rechazan su descendencia, etc., todo esto a causa de la mala selectividad en los progenitores cuando se realiza la cruce ó se utiliza la IA. Por otro lado los machos se pueden acostumbrar al manejo lo que puede ocasionar dificultades posteriores para realizar la monta natural, sin embargo esto es poco frecuente (Esquivel, 2002). Los buenos criadores observan sus líneas de cruzamiento y reconocen estos problemas. Ellos deben intentar eliminar estos rasgos, porque usando la IA para reproducir perros con limitaciones sólo potencializan el problema (Foster y Smith, 2001).

La IA puede favorecer la utilización fraudulenta del semen (Esquivel, 2002). Otra preocupación del uso de Inseminación Artificial, es cuando uno de los dos perros es vicioso y constantemente ataca al otro. Sería recomendable no cruzar, así como tampoco el emplear la Inseminación Artificial estos casos, y no por miedo a ser mordidos; la conducta es un rasgo que debemos seleccionar (Foster y Smith, 2001).

Muchos criadores también creen que si se usa la Inseminación Artificial no pueden transmitirse enfermedades que requieren del contacto sexual para su transmisión. Efectivamente, el macho no podrá contagiarse de la hembra, porque él nunca está en contacto con ella. Sin embargo, la hembra puede contraer varias enfermedades contenidas en el semen (Foster y Smith, 2001; Esquivel, 2002).

Además, debe recordarse que la Inseminación Artificial en medicina canina no tiene el nivel de éxito que una cruce natural. Dependiendo de la técnica y habilidad de aquellos que la realizan, se pueden esperar sólo tasas de 65 a 85% de concepción (Foster y Smith, 2001).

7.4. Limitaciones de la Inseminación Artificial en Caninos

Se han identificado dos grandes limitaciones en la utilización de la IA en perros; la longevidad de células espermáticas caninas disminuye grandemente refrigerando o congelando el semen; y la anatomía del cérvix canino que actúa como una barrera a la deposición intrauterina del semen vía inseminación vaginal (Brown, 1992).

VIII. EVALUACIÓN DE LOS REPRODUCTORES

El éxito de la IA 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 IA 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)

8.1. Evaluación del macho reproductor

La elección de un macho reproductor depende de:

- Su habilidad física de copular.
- Su conducta para copular (es decir su líbido).
- 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).

8.2. Evaluación de la hembra reproductora

En el caso de la perra, la evaluación ginecológica se hace con el objetivo de detectar anomalías del aparato reproductor (genitales externos), observar la presencia de secreciones anormales (pus), neoplasias y detectar si existe inflamación. Es necesario la realización del tacto vaginal ó la utilización de técnicas como la vaginoscopía para determinar que no existe ningún obstáculo que impida la cópula ó dificulte el parto (Esquivel, 2002).

8.2.1. Cultivo vaginal

Los dueños de machos piden a menudo un cultivo vaginal antes de aparear una perra externa a su criadero. Pero sin signos clínicos o una historia de trastorno reproductor, no se indican normalmente cultivos vaginales. Las perras tienen flora vaginal normal que se ha descrito. En un estudio de perras reproductoras normales, el 98% de las perras tenían resultados de los cultivos vaginales positivos para *Pasteurella multocida*, 89% para *Estreptococos hemolítico*, 84% para *Escherichia coli*, 67% para especies de *Pasteurella*, 59% para las especies de *Mycoplasma*, 55% para las especies de *Estreptococo*, 44% para *Enterococos*, 40% para especies de *Coryneformes*, 33% para

Staphylococcus intermedius, 25% para *Proteus mirabilis*, 22% para *Staphylococcus coagulasa negativa*, y 10% para las especies de *Pseudomonas*. Se encontraron resultados similares en cultivos de prepucios de perros normales. Por lo tanto, los resultados de el cultivo se deben interpretar cuidadosamente, utilizando una historia clínica completa, examen físico y citología vaginal para ayudar interpretarlos (Purswell y Parker, 2000).

a) Desventajas del cultivo

Requiriendo cultivos vaginales de perras pre-reproducción no sólo gastan tiempo y dinero, también pueden llevar a cabo una terapia antimicrobiana inapropiada. Un estudio mostró que usando drogas antimicrobianas en perras saludables promovieron el crecimiento de patógenos oportunos en la vagina como *E. coli* y especies de *Mycoplasma*. Algunas de las perras normales en este estudio desarrollaron descargas vulvares durante la terapia antimicrobial (Purswell y Parker, 2000).

8.2.2. *Brucella canis*

La prueba de *Brucella canis* siempre se debe hacer antes de la reproducción en los machos y hembras. Es aconsejable exigir examen de *Brucella* a todas las perras y perros que se pretenden cruzar. Las perras normalmente son portadores asintomáticas de *Brucella canis*, y el aborto es a menudo la primera señal de infección. Debe protegerse el perro que está montando rutinariamente o periódicamente aunque es improbable que un macho se infecte con *Brucella canis* sin mostrar signos clínicos, como orquitis (Purswell y Parker, 2000)

IX. COLECCIÓN DE SEMEN PARA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN CANINOS

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).

9.1. 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).

9.2. 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).

9.3. 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).

9.3.1. 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).

9.3.1.1. 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).

9.3.1.2. 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).

9.3.1.3. 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).

9.3.1.4. 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).

9.3.2. 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.

9.3.2.1. 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).

9.3.2.2. 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 Newbauer 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).

9.3.2.3. 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 (Daval, 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).

9.3.2.4. 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).

9.3.2.5. 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) Anomalías 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).

9.3.2.6. 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).

9.3.3. 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 (Davol, 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 (Davol, 2001; Birchard y Sherding, 1996).

9.3.4. Evaluación del "Hamilton Thorn" basada en un sistema automatizado computarizado.

Consiste en una evaluación objetiva de semen que garantiza evaluar la fertilidad del macho canino y seleccionar técnicas apropiadas y extensores para la preservación de semen (Iguer-ouada y Versteegen, 2001a).

9.4. Métodos de preservación del semen

El semen puede ser utilizado directamente en fresco, siendo también posible refrigerarlo para utilizarlo unos días después e incluso congelarlo para que pueda ser utilizado en varios años. Lo más frecuente es utilizarlo en fresco, pero en el futuro las otras posibilidades irán aumentando (Villalba, 1997). Sin embargo,

el refrigerado y congelado del semen de perro pueden tener efectos inmediatos y retardados en la ultraestructura de los espermatozoides. Los efectos inmediatos del refrigerado y congelado pueden matar a los espermatozoides o pueden causarles la incapacidad de fertilización dañando el acrosoma; los efectos retardados pueden reducir la longevidad del semen alterando la estructura de la membrana plasmática (Burgess *et al.*, 2001).

En algunos países en la actualidad, existen bancos de semen de ejemplares de gran calidad genética de distintas razas. Esto permitirá poder obtener descendencia de un animal que destaque por la causa que sea (Villalba, 1997).

Si la perra no va a ser cruzada o inseminada inmediatamente, el semen puede refrigerarse o congelarse. El semen refrigerado puede utilizarse 24 horas después de su recolección, y por consiguiente puede ser transportado por aire a cualquier parte del país y una hembra puede inseminarse con él, al día siguiente. Esto ha hecho a los machos disponibles destinarse a hembras por el mundo, sin que ninguno de los dos necesite viajar (Foster y Smith, 2001).

Para decidir si la perra es inseminada con semen fresco o semen congelado se deben considerar dos puntos fundamentales (Esquivel, 2002):

- a) La fertilidad obtenida cuando se insemina con semen congelado es menor en comparación con la fertilidad obtenida con semen fresco (83.8 % y 69.3 % respectivamente).
- b) La técnica para inseminar con semen congelado es más complicada porque se realiza intracervicalmente no intravaginalmente como ocurre con el semen fresco.

9.4.1. 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.*, 2001).

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 uso del semen fresco es 60% aproximadamente (Allen, 1992), aunque hay quien afirma que se puede obtener un 83.8 % (Esquivel, 2002). Y el tamaño de camada es 21.5% más pequeño en perras inseminadas con semen fresco, comparado con perras naturalmente apareadas (Linde-Forsberg y Forsberg, 1989).

Mientras el semen de eyaculados frescos pueden aplicarse con buen éxito intravaginalmente, la inseminación intrauterina mejora las condiciones para concepción usando semen congelado (Gunzel, 1986).

9.4.2. Semen refrigerado

Enviar el semen en lugar de enviar la perra se ha hecho común. Los criadores han escogido la utilización del semen refrigerado por inseminación

intrauterina para sus perras, en espera de buenas proporciones de concepción (Hutchison, 2001)

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

9.4.2.1. Técnica para la refrigeración del semen

Allen (1992), recomienda la siguiente técnica para refrigerar el semen canino:

- Colocar la segunda fracción del eyaculado en un baño maría (37 °C).
- Comprobar la motilidad.
- Se deposita una pequeña cantidad de diluyente (Leche de vaca pasteurizada pobre en grasa a 37 °C) en un tubo de 8 ml., añadir la segunda fracción y llenar hasta arriba con diluyente.
- Comprobar la motilidad del semen con el diluyente (los glóbulos de grasa provocan cierta dificultad para el movimiento de las células espermáticas).
- Tapar el tubo y envolverlo en unos 3 mm de espesor de papel de seda.
- Introducir el tubo en un frasco universal.
- Colocar el frasco rodeado de cubos de hielo en el interior del termo; el aislamiento excesivo impedirá la refrigeración de la muestra; un aislamiento insuficiente puede provocar la congelación de la muestra y la muerte de los espermatozoides.
- La muestra se mantendrá viable por 48 horas.
- Si se efectúan dos inseminaciones, el resto de la muestra se mantendrá a 4°C

Stornelli (2001), hace las siguientes recomendaciones. Para la refrigeración se colecta la fracción espermática del semen y se mezcla con el diluyente elegido, el cual debe encontrarse a la temperatura del semen en el momento de la dilución. Entre semen y diluyente debe respetarse una relación 1:3 o 1:4, una proporción excesiva de diluyente tendrá influencias negativas sobre la motilidad. El semen así preparado puede refrigerarse a 4 °C y utilizarse para IA lográndose tasas de preñez aceptables durante las primeras 24 a 48 horas. Antes de realizar la IA el semen refrigerado debe alcanzar lentamente la temperatura ambiente (Stornelli *et al.*, 2001). Las tasas de gestación utilizando semen refrigerado son del 50 a 60% (Allen, 1992)

Un estudio fue realizado para evaluar la conservación de semen refrigerado por un tiempo mayor al indicado en 3 extensores comerciales y 4 preparados comerciales, incluyendo un nuevo extensor Tris-glucosa, y utilizando yema de huevo, con el fin de determinar si la yema de huevo tiene influencia en la preservación del semen refrigerado. No fue observada ninguna diferencia significativa al comparar los diferentes extensores comerciales sin la yema del huevo, pero la adición de yema de huevo mejoró todos los parámetros de motilidad. Los resultados (en orden decreciente) fueron como sigue: Biladyl > green extender > fresh-phos. Los parámetros de motilidad fueron mejor en preservación con yema de huevo suplementado con Biladyl, con un porcentaje de motilidad espermática de 86.3+/-10.5 después de 7 días a 4°C. La yema del huevo tiene un efecto protector que reduce reacciones del acrosoma significativamente en todos los medios probados y ofrece mejor protección para los parámetros de motilidad espermática a 4°C (Iguer-ouada y Verstegen, 2001b).

Dentro de los diluyentes más utilizados se encuentra el tris-buffer con el agregado de 20 % de yema de huevo (TYH) y diluyentes compuestos por yema de huevo y crema o leche descremada. Con la utilización de tris-buffer con el agregado de 20 % de yema de huevo como diluyente se han obtenido tasas de preñez de 62,5 % (Stornelli *et al.*, 2001).

9.4.3. Semen congelado.

La congelación de semen canino es un procedimiento que no puede realizarse en la práctica veterinaria diaria, ya que requiere equipos especiales y personal especializado en el área. Sin embargo el uso de semen congelado puede implementarse respetando algunas normas básicas de manejo y descongelado del mismo (Stornelli *et al.*, 2001). Antes de congelar el semen es muy importantes someterlo a una evaluación (Morton, 1986). Debido a la falta de energía de los espermatozoides, un pulidor (buffer) de constitución química, resistencia cervical, la tasa de concepción de semen canino criopreservado han sido históricamente bajas cuando se utilizaba inseminación vaginal (Hutchison, 2001).

Mediante la congelación es posible el uso del semen de un macho cuando este ya no puede ser usado como reproductor, inseminar una hembra que se encuentre en una localización geográfica distante (Morton, 1986; Stornelli *et al.*, 2001). Si consideramos el costo del macho y/o el costo de transportar uno o los dos progenitores para la reproducción, el semen congelado y refrigerado son relativamente más económicos. Además, aumenta grandemente el número de sementales potenciales para escoger (Foster y Smith, 2001; Morton, 1986). Así mismo un banco de semen puede constituir un importante reservorio genético para la conservación de razas en las que la población pueda disminuir drásticamente en el futuro. El semen canino puede congelarse en pastillas o en pajuelas (pajillas) de 0,5 o 0,25 ml. Las pastillas, difíciles de identificar, se usan ocasionalmente a diferencia de las pajuelas que son preferidas por su más fácil identificación y mejor manejo en el descongelado del semen (Stornelli *et al.*, 2001).

La deposición en el lumen uterino ha producido proporciones de concepción iguales que aquellos de la cruce natural (Hutchison, 2001), tasas de gestación de 40-80% (Allen, 1992) Y cuando se ha comparado con el uso de semen fresco tenemos que el tamaño de camada en perras inseminadas con semen congelado fue de 23.3% más pequeño que en perras inseminadas con semen fresco. Se asume que esta diferencia es atribuible a un tiempo de supervivencia más largo de

varios días del semen fresco que para semen congelado. Además con semen congelado no se ha obtenido ninguna gestación cuando la calidad de semen es pobre, en cambio con semen fresco de baja calidad si se reportan gestaciones, aunque de menor número de cachorros (Linde-Forsberg y Forsberg, 1989)

9.4.3.1. Técnica de congelación de semen

Allen (1992) recomienda la siguiente técnica para la congelación del semen canino, utilizando como almacenamiento pajillas:

- Recolectar sólo la segunda fracción del eyaculado.
- Diluir con Tris-fructosa-ácido (pH 6,8) con el 8% de glicerina y agregar 20% de yema de huevo.
- Alcanzar una concentración final de 100×10^6 espermatozoides/ml.
- Mantenerlo a 4°C durante 2 horas.
- Aspirar 0,5 ml. ó 0,25 ml. hacia el interior de pajillas, dejando 1 cm de aire en ambos extremos de la pajilla.
- Cerrar el extremo abierto de la pajilla con alcohol polivinilo en polvo e introducir en agua.
- Mantener las pajillas sobre vapor de nitrógeno líquido (unos 4 cm. de la superficie) durante 8 minutos.
- Posteriormente introducir y conservar las pajillas en nitrógeno líquido.

9.4.3.2. Técnica para descongelar semen canino

Allen (1992), recomienda colocar las pajillas en baño maría a 70°C durante 8 segundos, y garantiza que la motilidad será mayor al 50%. Sin embargo, cada tipo de almacenamiento (pastillas, pajillas ó pajuelas) requiere diferentes condiciones de descongelado:

- Las pastillas se descongelan a 37 °C utilizando solución salina de cloruro o citrato de sodio como diluyente.
- Las pajillas ó pajuelas de 0,5 ml. se descongelan en baño térmico a 37 °C durante 1 minuto ó a 75 °C durante 6 segundos.

- Las minipajuelas (0,25 ml.) deben descongelarse a 75°C durante 5 segundos (Stornelli *et al.*, 2001).

9.4.3.3. Supervivencia del espermatozoide después de descongelar

El congelado-descongelado del semen causan una disminución inmediata o retardada en la viabilidad del espermatozoide (Burgess *et al.*, 2001). Esto es quizá lo que explica las bajas tasas de concepción que se logran con el uso del semen congelado en IA (Morton, 1986).

Se estima que entre el 40 y 50% de la población de espermatozoides no sobrevive al proceso de congelación-descongelación. Por otro lado, parte de la población de espermatozoides que sobreviven habrán sufrido daños que los vuelve incapaces de fecundar. Es por esto que debe considerarse un protocolo de criopreservación que no sólo logre una gran población de sobrevivientes sino también la integridad de las células que lo conforman (Stornelli *et al.*, 2001).

Se han realizado diferentes estudios con el objetivo de determinar y disminuir los daños que ocasiona el proceso de descongelado al semen canino:

- a) Un estudio fué enfocado en la evaluación la supervivencia y longevidad post-descongelación de espermatozoides del perro durante la incubación a 38 °C, usando 4 concentraciones espermáticas diferentes (50×10^6 , 100×10^6 , 200×10^6 y 400×10^6 espermatozoides/ml.) en pajillas de 0.5 ml. y diluyendo el semen descongelado a las proporciones de 1:0, 1:1, 1:2 y 1:4 (semen:buffer), respectivamente, haciendo un total de 16 tratamientos. La mejor longevidad fue obtenida cuando el semen se empaquetó a una concentración de 200×10^6 espermatozoides/ml. y se diluyó inmediatamente después de descongelar a una proporción de 1:4 (Pena y Linde-Forsberg, 2000a).

- b) Otro estudio se realizó con el objetivo de evaluar los efectos de agregar Equex a un TRIS-extender, diluyendo el semen en 1 ó 2 pasos, congelando según 2 métodos, descongelando a 2 proporciones, analizando la supervivencia de los espermatozoides del perro post-descongelación a 37°C. Los eyaculados se concentraron a 9×10^9 espermatozoides/ml., y se agregó Ext-1 para obtener 200×10^6 espermatozoides/ml. La mejor supervivencia post-descongelación y termorresistencia de los espermatozoides se obtuvo cuando Equex estaba presente en el extensor ($P < 0.0001$); y las pajillas se descongelaron a 70°C por 8 segundos en lugar de a 37°C por 15 segundos ($P < 0.0001$) (Pena y Linde-Forsberg, 2000b). La adición de Royal Jelly a diluyentes con Equex parece tener efectos sinérgicos en la viabilidad espermática al descongelado (Stornelli *et al.*, 2001).
- c) En otro estudio se observó el efecto de la inclusión de leche desnatada en extensores congelados sobre la motilidad, viabilidad y morfología del acrosoma de espermatozoides caninos después de descongelar. Y se observó que a los 120 minutos después de descongelar, la viabilidad espermática fue significativamente mayor en un extensor en el que el buffer había sido completamente reemplazado por leche, que en el que había sido reemplazado parcialmente. En conclusión el uso de leche desnatada en extensores para semen canino congelado produce motilidad de semen y viabilidad después de descongelar (Rota *et al.*, 2001).

Existe una nueva tinción fluorescente triple que fue desarrollada para evaluar espermatozoides de perro post-descongelación. Con ésta tinción se evalúa la integridad de la membrana plasmática y estado acrosomal de los espermatozoides usando una combinación de 3 tintes fluorescentes (Pena *et al.*, 1999):

1. *Carboxy-SNARF-1(SNARF)*, que sirve para identificar los espermatozoides vivos.
2. *Propidium iodide (PI)*, que sólo colorea células muertas o células con membranas dañadas.
3. *Fluorescein isothiocyanate (FITC)*, que envuelve al contenido acrosomal de espermatozoides con plasma dañado y las membranas de acrosomas extensas.

Este nuevo método de triple tinción para evaluar la viabilidad espermática canina y la integridad del acrosoma proporciona un procedimiento eficaz para la evaluación de muestras de semen canino congelado-descongelado junto con citometría de flujo o microscopía de fluorescencia (Pena *et al.*, 1999).

También se ha demostrado que el análisis de la envoltura de la Zona pelúcida proporciona información sobre la habilidad de fertilización de los espermatozoides. En pruebas *in vitro* da una mejor estimación del daño causado por varios procedimientos cuando se desarrollan nuevas técnicas para enfriamiento y congelado-descongelado de semen (Strom *et al.*, 2000).

X. TÉCNICAS DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN CANINOS

En el servicio natural el macho realiza la eyaculación dentro de la vagina de la hembra. En la IA el depósito del semen en el tracto genital femenino puede realizarse dentro de la vagina o dentro del cuerpo del útero dependiendo de la calidad del semen y del uso de semen fresco, refrigerado o congelado. Cuanto más alto en el tracto genital femenino sea realizada la inseminación, menos espermatozoides necesitaremos para lograr la fertilización (Stornelli *et al.*, 2001).

Cuando se trabaja con semen fresco se utiliza IA intravaginal, reservando la vía intrauterina cuando se trabaja con semen hipospérmico (refrigerado o congelado). La IA intravaginal es una técnica sencilla que se aplica también con semen refrigerado. Cuando se trabaja con semen congelado la IA es usualmente intrauterina, aunque algunos autores obtienen buenos resultados con IA intravaginal (Stornelli *et al.*, 2001).

La Inseminación Artificial (IA), constará de una primera recolección y valoración del semen en el macho y de la técnica de inseminación en la hembra (Villalba, 1997).

Considerando la baja complejidad para la realización de la IA con semen fresco o refrigerado y las posibilidades que brinda, en poco tiempo será utilizada más frecuentemente si se difunde adecuadamente su técnica de realización, manejo y aplicaciones. La IA con semen congelado requiere un mayor desarrollo de la metodología de congelación. Sin embargo, el trabajo realizado en el área indica que en un futuro cercano estará disponible la posibilidad de acceder a bancos de semen canino congelado (Stornelli *et al.*, 2001).

10.1. Tiempo de Inseminación

La Inseminación Artificial exitosa en el perro requiere un buen cronometraje de la inseminación, la colección experimentada, manejo del semen, y el dominio de las técnicas de inseminación (Linde-Forsberg, 1991). Las particularidades fisiológicas de los caninos dificultan la estimación del momento de mayor fertilidad de la hembra sin el uso de métodos complementarios para predecir la ovulación (Jhonston *et al.*, 2001). La IA debe ser realizada en el momento adecuado para que los espermatozoides puedan interrelacionar con óvulos maduros capaces de ser fecundados, de otro modo no será un procedimiento exitoso. Este factor es crítico cuando se trabaja con semen criopreservado (Stornelli *et al.*, 2001).

Cuando se trata de una cruce natural, el tamaño máximo de camada se logra cuando la perra se aparea 2 días después de la ovulación (Día 4 después de la ola de LH). Una sola monta 2 a 3 días después de la ovulación producirá gestación en una perra reproductora saludable (Daval, 2000). La razón del porque la concepción óptima ocurre 2 días siguientes a la ovulación es porque cuando la ovulación ocurre, los óvulos son inmaduros (oocitos primarios) y deben sufrir dos divisiones meióticas antes de que éstos puedan fertilizarse. Estas divisiones pueden tomar de 48 a 72 horas para ocurrir (Stornelli *et al.*, 2001; Davol, 2000). Una vez maduros, los óvulos permanecen viables durante otros 2 a 3 días (Daval, 2000), aunque hay quien afirma que pueden ser viables durante 4 o 5 días (Stornelli *et al.*, 2001). Como el semen normal del macho depositado por monta natural puede vivir en el tracto reproductor durante por lo menos 5 a 6 días, la concepción exitosa puede ocurrir si una perra se cruza 2 días antes de la ovulación a 4 días después de la ovulación (Daval, 2000).

Para inseminar artificialmente se procede de manera semejante. Si estimamos el día en que ocurre el pico preovulatorio de la Hormona Luteinizante (LH), dos días más tarde ocurrirá la ovulación de oocitos primarios, los cuales madurarán en aproximadamente 48 horas (Stornelli *et al.*, 2001). Los óvulos permanecerán capaces de ser fecundados 2 a 3 días (Daval, 2000) y según

Stornelli por 4 ó 5 días (Stornelli *et al.*, 2001), momento en el cual realizaremos la IA.

El momento óptimo para realizar la IA también depende de la técnica de inseminación y del tipo de semen que se va a utilizar. El semen fresco o refrigerado debe introducirse por medio de la inseminación intravaginal por lo menos 2 días después de que la ovulación ha ocurrido en la perra (Daval, 2000). Si trabajamos con semen congelado el momento indicado para realizar la IA será entre 72 y 96 horas después de la ovulación (Stornelli *et al.*, 2001).

10.2. Dosis de Inseminación

La dosis de la inseminación debe contener 150 a 200 x 10⁶ de espermatozoides, por lo menos (Stornelli *et al.*, 2001; Linde-Forsberg, 1991), pero tratándose de semen congelado se estima que 200 X 10⁶ espermatozoides viables al descongelado son necesarios para obtener tasas aceptables de preñez (Jhonston *et al.*, 2001). Sin embargo, se han comunicado preñeces con 20 x 10⁶ de espermatozoides depositando quirúrgicamente semen fresco en la porción proximal del cuerno uterino y dos dosis de 30-35 x 10⁶ de espermatozoides realizando IA intrauterina por medio de cateterización cervical con endoscopio (Stornelli *et al.*, 2001)

Las mejores proporciones de concepción pueden obtenerse con una doble inseminación que por una sola inseminación (Gunzel, 1986; Linde-Forsberg y Forsberg, 1989).

10.3. Inseminación Artificial Intravaginal

Cuando una cruce natural no es posible, la inseminación intravaginal es una buena opción, que consiste en depositar el semen en la apertura cervical externa. Este método también puede ser aplicable cuando una cruce natural puede ser un riesgo de enfermedad, lesión a los perros, o una molestia al propietario de alguno de los reproductores (Hutchison, 2001).

Un dedo enguantado (ligeramente lubricado con agua), se introduce en la vagina y la pipeta se guía por encima del dedo, se prolonga en el pasaje vaginal hasta donde sea posible. El semen se expelle entonces de la pipeta seguida por un poco de aire para empujar el semen restante del tubo. La pipeta se retira, pero el dedo permanece para masajear (suavemente raspando en un movimiento dirigido hacia atrás) la pared de la vagina. Este procedimiento es muy importante porque simula la acción del suave jalado del pene del macho dentro de la vagina durante la "unión" en la crucea natural. Este procedimiento inducirá contracciones del músculo de las paredes vaginales que ayudarán a la locomoción del semen hacia los óvulos. Después de varios minutos de este estímulo, el dedo enguantado es retirado (Davol, 2000).

Hay técnicas más sencillas en las que sólo se introduce una sonda en la vagina llegando hasta el fondo de la misma y con una jeringa se impulsa el semen (Morton, 1986; Villalba, 1997). Y otras en las que se requiere de un catéter de plástico rígido que inicialmente se introduce verticalmente a través de los labios de la vulva, (evitando la fosa del clítoris), y al llegar a la parte posterior del isquion se dirige cranealmente adecuándose a la anatomía de la hembra canina (Allen, 1992; Stornelli *et al.*, 2001). Si lo permite la perra el catéter será palpado a través de la pared abdominal y el cuello uterino se localiza como una estructura dura (similar a un guisante) craneal al mismo, se levantan del suelo las extremidades posteriores de la perra y se expulsa el semen (Allen, 1992)

La totalidad del material utilizado deberá estar estéril, libre de sustancias que alteren la viabilidad espermática y precalentado a 37 °C para evitar alterar la calidad del eyaculado (Stornelli *et al.*, 2001).

El inconveniente de una inseminación intravaginal es que el semen se deposita en la vagina craneal y debe hacerse de manera que se arrastre ó penetre hasta el útero, para que las células espermáticas puedan llegar a los tubos de Falopio (alrededor de los ovarios) donde ocurre la concepción (Hutchison, 2001). Por lo tanto, para inseminar a la hembra se eleva el tercio posterior de ésta favoreciendo la penetración del semen y posteriormente se mantiene durante

cinco o diez minutos (Allen, 1992; Villalba, 1997; Davol, 2000), ó hasta quince (Allen, 1992; Stornelli *et al.*, 2001), para evitar el reflujo del semen. El reflujo de una porción del semen indica que se ha realizado una mala inseminación (Allen, 1992). Hay quien recomienda para detener el reflujo del semen, insertar un dedo o algún objeto plástico del tamaño apropiado en la parte caudal de la vagina (Morton, 1986). Debe tenerse cuidado para asegurar que ninguna presión se haga alrededor del abdomen, por consiguiente, el alzado de la perra debe ser realizado sujetándola de sus rodillas. Después la perra debe ser inmediatamente enjaulada durante 30 a 60 minutos. No se debe permitir que orine (Allen, 1992; Davol, 2000), y si se requiere que la perra sea puesta en una jaula en un vehículo, debe ser cargada por dos personas, la persona que alza el tren posterior sujetándola de las rodillas y no alrededor del abdomen (Davol, 2000). Por otra parte, Esquivel (2002), asegura que no es necesario considerar ninguno de los aspectos antes mencionados.

La inseminación con semen fresco puede realizarse vaginalmente, por el contrario el semen congelado-descongelado debe depositarse intrauterinamente (Linde-Forsberg, 1991).

Problemas de la técnica, como colocación impropia de la pipeta de inseminación, colocación de semen impropio, o semen dañado por maltrato, desgraciadamente ha convencido a muchos criadores y veterinarios de que sólo deben usar la IA como una última medida (Hutchison, 2001).

Para comparar la importancia de la ruta de inseminación al usar semen fresco o congelado, seis grupos de cinco perras se inseminaron en el útero (grupos 4, 5 y 6) o en la vagina (grupos 1, 2 y 3) con semen fresco (grupos 1 y 4) o semen congelado (grupos 2, 3, 5 y 6). El 60% de las perras inseminadas con semen congelado y el 100 % de las perras inseminadas con semen fresco quedaron gestantes, independientemente de la técnica de inseminación usada (Silva *et al.*, 1996).

10.4. Inseminación Intrauterina

La deposición intrauterina del semen es utilizada para aumentar las tasas de concepción obtenidas con el uso del semen canino congelado, con el tiempo se ha vuelto una técnica rutinaria usada en numerosas situaciones en medicina reproductiva canina (Hutchison, 2001). La Inseminación Artificial intrauterina puede realizarse depositando el semen en el útero a través de la cateterización de cérvix ó inoculándolo directamente en el cuerpo o cuernos uterinos en forma quirúrgica. La elección de la técnica dependerá de la calidad y tipo de semen utilizado, y de los equipos disponibles (Stornelli *et al.*, 2001).

Situaciones donde la deposición intrauterina de semen puede ser útil (Hutchison, 2001):

- Semen congelado
- Semen refrigerado
- Semen fresco
- Perras con enfermedad uterina u ovárica sospechosa
- Machos con proporciones de espermatozoides comprometidas.

El útero no es accesible fácilmente debido a que el cérvix es difícil alcanzar, pequeño en diámetro, e irregularmente formado (Hutchison, 2001), por otra parte el canal cervical se abre hacia la cara dorsal de la vagina, y no en su extremo (Allen, 1992).

Cuando se utiliza la inseminación con semen congelado se tienen que considerar los siguientes aspectos para asegurar la concepción exitosa. Primero, la viabilidad de semen congelado-descongelado está significativamente reducida y como resultado comparado a semen fresco o refrigerado que puede mantenerse por 5 o 6 días en el tracto reproductor de la perra, el semen congelado-descongelado vive sólo unas horas, de tal manera que los óvulos deben estar maduros cuando el semen congelado-descongelado se introduce. Por consiguiente, la inseminación con semen congelado-descongelado se realiza los 3-4 días siguientes a la ola de

la Hormona Luteinizante (LH) (2-3 días siguientes a la ovulación). Segundo, el semen congelado-descongelado es insuficientemente móvil para alcanzar los óvulos si es introducido por inseminación intravaginal. Por esta razón, se han logrado las proporciones más altas de concepción con semen congelado usando inseminación intrauterina. Alternativamente, la cateterización transcervical se ha utilizado para depositar el semen dentro del útero (Davol, 2000).

Los porcentajes de concepción de Inseminación Artificial con semen congelado en la perra son mejores con deposición intrauterina que con deposición intravaginal (Fontbonne y Badinand, 1993).

10.4.1. Inseminación intrauterina transcervical

Un método de inseminación intrauterina es la inseminación transcervical a través de la vagina. La vagina canina es relativamente larga (10 a 14 cm. en una perra de 24lb. (11kg.) y mayor de 29 cm. en perras de raza gigante) (Purswell y Parker, 2000).

La IA intrauterina puede realizarse mediante la cateterización del cuello uterino con catéteres de 20 a 50 cm de longitud y 0,5 mm de diámetro, con la punta protegida por una cubierta de nylon (catéter Noruego) (Stornelli *et al.*, 2001). El operador fija el cérvix entre sus dedos a través de la pared abdominal, con la otra mano introduce el catéter hasta la región del cuello, retira la cubierta de nylon y penetra el cuello uterino para depositar el semen en el cuerpo del útero. No es necesario sedar al animal, pero el operador necesita entrenamiento previo para realizar correctamente la técnica (Stornelli *et al.*, 2001).

Se puede utilizar también un doble catéter especial, primero se introduce de manera semejante a la inseminación vaginal; cuando el catéter externo de plástico llega al cuello uterino, se manipula el catéter interno de metal a través del canal cervical con una mano mientras que con la otra mano se orienta el cuello uterino transabdominalmente (Allen, 1992).

Se recomienda también un equipo de endoscopia fibro óptica para este propósito, debe tener longitud y diámetro suficiente para acceder a la vagina

anterior (Purswell y Parker, 2000; Stornelli *et al.*, 2001). Este método permite al operador visualizar el cuello facilitando la maniobra de cateterización uterina (Stornelli *et al.*, 2001).

Las ventajas de esta técnica sobre la inseminación quirúrgica incluyen evitar el estrés de anestesia y cirugía, y tener la facilidad de hacer inseminaciones múltiples durante varios días que pueden aumentar el éxito de la reproducción (Purswell y Parker, 2000; Wilson, 2001), pero no parece haber ninguna diferencia significativa en la tasa de gestación y tamaño de la camada con respecto a la técnica quirúrgica (Davol, 2000).

El cérvix canino está en el abdomen, y el lumen cervical corre caudoventralmente del útero a la vagina. Debido a estas características anatómicas en perros, es necesario equipo especializado para cateterizar el cérvix (Purswell y Parker, 2000) Durante el proceso de aprendizaje estará preocupado por la baja concepción, pero el resultado de la experiencia merece el esfuerzo. La endoscopia no debe tratarse como algo especial o único para la IA con semen congelado, pero debe usarse a cada oportunidad para desarrollar experiencia y especialización en todas las situaciones (Wilson, 2001).

Usando un buen método para la criopreservación, junto con la IA intrauterina no quirúrgica empleando el catéter noruego, puede rendir proporciones de pariciones y tamaños de camada similares a aquellos reportados de cruza naturales bien controladas (Linde-Forsberg *et al.*, 1999). Se tienen informes de un porcentaje de gestación 69% con semen congelado transcervicalmente. (Linde-Forsberg, 1991). Además, éste es el primer estudio para mostrar que la deposición intrauterina de semen de perro congelado-descongelado produce un porcentaje de pariciones significativamente más alta y mayor número de cachorros (Linde-Forsberg *et al.*, 1999).

La proporción de pariciones es más alto utilizando la inseminación intrauterina transcervical (71%) que utilizando la inseminación intravaginal (29%).

Los tamaños de camadas no son significativamente diferentes. Estos resultados muestran el potencial de la inseminación de intrauterina transcervical comparada con la Inseminación Artificial rutinaria en perros (Thomassen *et al.*, 2001).

10.4.2. Inseminación intrauterina quirúrgica

La inseminación quirúrgica en perras fue introducida primero cuando estaba investigándose semen congelado en perros. Debido a la situación abdominal del cérvix canino y la ruta perpendicular del lumen cervical, es difícil de acceder al útero canino vía vaginal. Se obtuvieron buenas tasas de concepción en perras cuando el semen congelado se depositó directamente en el útero. Esto se hace fácilmente a través de una incisión de laparotomía. Se considera que la inseminación quirúrgica es una terapia aceptable para la infertilidad en perras, ya que un porcentaje alto de perras que no quedaban preñadas después de un intenso manejo reproductivo, concibieron cuando se inseminaron quirúrgicamente (Purswell y Parker, 2000).

Se han desarrollado varios métodos quirúrgicos con el propósito de depositar semen en el útero. Laparotomía y laparoscopia (Davol, 2000).

La técnica para la inseminación quirúrgica es sencilla. Después de la preparación quirúrgica rutinaria de la región caudal del abdomen, se hace una incisión abdominal encima del cuerpo del útero. se exterioriza el cuerpo del útero a través del sitio de incisión. Se inyecta el semen a través de la pared hasta el cuerpo del útero usando una jeringa con una aguja de 20ga o a través de una de 2in, catéter intravenoso de 20ga puesto en un orificio preperforado en la pared uterina. Se puede hacer el orificio usando el extremo despuntado de una aguja de sutura. Puede usarse semen fresco, refrigerado o congelado, aunque se prefiere el semen fresco. Inyecte el semen en el cuerpo uterino con una aguja o catéter dirigido hacia los cuernos uterinos. Se podrá ver y sentir el llenado del lumen uterino con semen. Realice una presión digital encima del sitio de la inseminación

cuando usted quite la aguja o catéter. Entonces devuelva el útero al abdomen, y cierre el sitio de incisión rutinariamente. Medir el tiempo de la ovulación, es obligatorio al usar inseminación quirúrgica con semen congelado (Purswell y Parker, 2000)

Es una práctica sencilla pero el número de inseminaciones es limitado y deben extremarse las medidas para evitar infecciones. También puede realizarse mediante laparoscopia, técnica utilizada rutinariamente en ginecología humana. Sin embargo, el costo de los equipos hace que esta técnica se utilice con poca frecuencia (Stornelli *et al.*, 2001)

La mayoría de los autores logran mejores resultados utilizando inseminación intrauterina (mediante laparotomía, laparoscopia o cateterismo cervical) para el uso de semen congelado. Los porcentajes de preñez obtenidos con el uso de inseminación intrauterina varían entre 60% y 90 %, ésta variación puede explicarse por el uso de diferentes diluyentes, envasado y metodología de congelación y descongelación utilizadas, así como la disponibilidad de material y equipo, además de la experiencia de cada especialista. Los resultados obtenidos en IA con semen congelado (porcentaje de preñez y tamaño de camada) son inferiores a los obtenidos en IA con semen fresco, sin embargo son lo suficientemente buenos, como para estimular su uso en especial cuando un reproductor es realmente valioso (Stornelli *et al.*, 2001).

CONCLUSIÓN

Si bien la IA con semen fresco es una práctica usada rutinariamente en la reproducción de caninos, no ocurre lo mismo con la IA con semen criopreservado (refrigerado o congelado). Sin embargo, el estudio de los factores que permiten una mejor criopreservación de semen relacionados con los procesos de refrigerado, congelado y descongelado, harán posible en el futuro la aplicación de esta biotecnología.

Es importante destacar que el proceso de refrigeración de semen canino es de bajo costo y de fácil realización, y se puede lograr con poco equipo. El semen refrigerado puede utilizarse realizando IA intravaginal, técnica poco costosa y de baja complejidad. La implementación de técnicas de refrigeración de semen e Inseminación Artificial con semen refrigerado en nuestro país permitirá a los médicos veterinarios brindar un nuevo servicio, aumentar sus ingresos y mejorar su práctica diaria.

Por otra parte, la congelación de semen canino aplicando metodologías que permitan obtener porcentajes aceptables de espermatozoides viables al descongelado hará posible introducir esta biotecnología en nuestro medio. Si bien el proceso de congelación de semen canino requiere un moderado costo, equipo e infraestructura, su utilización puede ser aplicada en la práctica diaria mediante el uso de técnicas de IA intrauterinas sencillas (IA quirúrgica) que no requieren más entrenamiento que el necesario para realizar una ovariectomía, práctica de rutina en el ejercicio profesional.

La conservación de la integridad estructural y de la fisiología espermática forman parte de los factores que permiten altos porcentajes de preñez y tamaño de camada mayores. Con el desarrollo de la criopreservación 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.

LITERATURA CITADA

Allen, E. 1992. Fertility and obstetrics in the dog. Oxford (England): Blackwell Scientific publications limited. p. 1-175.

Birchard, S. J. y R. G. Sherding. 1996. Manual Clínico de Pequeñas Especies. Tomo II, México: McGraw-Hill. p. 1044-45.

Brown, R. M. 1992. An update of artificial insemination with fresh, chilled, and frozen semen. Probl Vet Med. 4(3): p. 445-52.

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.

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.

Cunningham, J. G. 1999. Fisiología Veterinaria. 2° ed México: McGraw-Hill. p. 561-70.

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]

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]

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.

Farstad, W. 2000. Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology*, 53(1): p. 175-86.

Fayrer, H. F. 1996. Canine Theriogenology Notes (Male). IAM.

<http://lam.vet.uga.edu/LAM/LM000030.HTML#VII.%20%20Sex%20hormone%20a%20lopecias>.> [Consulta: 20 de Mayo de 2002]

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.

Foster, R. y M. Smith. 2001. Artificial Insemination (AI). PetEducation. <http://www.peteducation.com/repro/AI.htm>.> [Consulta: 25 de Mayo de 2002]

Gunzel, A. R. 1986. Sperm collection, evaluation, preservation and artificial insemination in the dog. *Tierarztl Prax*, 14(2): p. 275-82.

Hutchison, R. V. 2001. Canine Reproduction for Breeders, Seminar. Company at the 2001 Westminster Kennel Club Show.

<http://www.amchessieclub.org/conception.html>.> [Consulta: 6 de Julio 2002]

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.

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

Jhonston, D. J., M. V. R. Kuztritz y P. Olson. 2001. Canine and feline theriogenology. Philadelphia (United States): Ed. Saunders. 16:287-306.

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.

Linde-Forsberg, C., H. B. Strom y G. Govette. 1999. Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: a retrospective study. *Theriogenology*, 52(1): p. 11-23.

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.

Morton, D. B. 1986. Review on the use of frozen semen in dog breeding. *Animal Technology*, 37(1): p. 67-71

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.

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.

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

Pérez, O. A. 2001. *Historia Veterinaria: Verdades y mitos sobre lo que han hecho los Veterinarios (Conclusión)*.

<<http://www.visionveterinaria.com/historia/04dic2001.htm>> [Consulta: 25 de Agosto de 2002]

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.

Purswell, B. J. y N. A. Parker. 2000. Modern breeding management in dogs. *Veterinary Medicine*.

<<http://www.hilltopanimalhospital.com/modern%20breeding%20management.htm>> [Consulta: 29 de Septiembre de 2002]

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.

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.

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.

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.

Sisson, S., J. D. Grossman y R. Getty. 1993. Anatomía de los animales domésticos. 5° ed. Tomo II, México: Salvat. p. 1728-41.

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.

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.

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.

Villalba, G. A. 1997. La inseminación artificial. Infomascota.

<<http://www.infomascota.com>> [Consulta: 30 de Abril de 2002]

Wilson, M.S. 2001. Transcervical insemination techniques in the bitch. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 31(2): p. 291-304.