

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO  
UNIDAD LAGUNA**

**DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



**TESINA**

**EVALUACIÓN Y APLICACIÓN DE INSEMINACIÓN  
ASISTIDA EN CANINOS DE LA RAZA BULLDOG CON  
SEMEN FRESCO Y REFRIGERADO**

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

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**PRESENTA**

**FROYLAN HERNANDEZ MARTINEZ**

**ASESOR:**

**MC. Francisco J Carrillo Morales**

**TORREÓN, COAHUILA**

**MARZO DE 2008**

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



**TESINA**

**EVALUACIÓN Y APLICACIÓN DE INSEMINACIÓN  
ASISTIDA EN CANINOS DE LA RAZA BULLDOG CON  
SEMEN FRESCO Y REFRIGERADO**

**APROBADO POR EL COMITÉ**

**PRESIDENTE DEL JURADO**

---

**MC FRANCISCO J CARRILLO MORALES**

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

---

**MC. JOSÉ LUIS FCO. SANDOVAL ELÍAS**

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



**TESINA**

**EVALUACIÓN Y APLICACIÓN DE INSEMINACIÓN ASISTIDA EN  
CANINOS DE LA RAZA BULLDOG CON SEMEN FRESCO Y  
REFRIGERADO**

**APROBADA POR EL JURADO EVALUADOR**

---

**MC FRANCISCO J CARRILLO MORALES  
PRESIDENTE**

---

**MVZ. RODRIGO I. SIMÓN ALONSO  
VOCAL**

---

**MVZ. JUAN MANUEL GUILLEN SAENZ  
VOCAL**

---

**MVZ. CUAHUTEMOC FELIX ZORRILLA  
VOCAL SUPLENTE**

## **TITULO**

# **EVALUACION Y APLICACIÓN DE INSEMINACIÓN ASISTIDA EN CANINOS DE LA RAZA BULLDOG INGLES CON SEMEN FRESCO Y REFRIGERADO**

### **Resumen**

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. Si se extrae semen de buena calidad, se lo 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 alentadores. Sin embargo, si los factores mencionados no son adecuadamente controlados puede tornarse una práctica desalentadora.

Empleando una pareja de perros Bulldog Ingles se describe, por primera vez en la UAAAN UL, una inseminación artificial empleando semen canino refrigerado. El semen fue obtenido por manipulación digital y diluido con leche semidescremada UHT con antibióticos en relación 1:4 y refrigerado a 5°C. Se practicaron 3 inseminaciones a partir del tercer día del estro, el cual fue determinado mediante exámenes de citología vaginal, considerándose inicio del estro cuando las células superficiales constituían sobre el 80% del total de células vaginales en los frotis. Se inseminó con dosis refrigeradas por 24 y 48 horas y con una concentración promedio de 600 millones de espermatozoides totales. El diagnóstico de gestación, mediante palpación y ultrasonido, se realizó 28 días después de la última inseminación y la perra parió 6 cachorros vivos 63 días después de la última inseminación.

**Palabras claves:** Inseminación artificial caninos- semen refrigerado- semen congelado

## **TITULO**

# EVALUACION Y APLICACIÓN DE INSEMINACIÓN ASISTIDA EN CANINOS DE LA RAZA BULLDOG INGLES CON SEMEN FRESCO Y REFRIGERADO

## INTRODUCCIÓN

### Breve bosquejo histórico

Mientras que la historia de la Inseminación Artificial en México data solamente desde finales de los años 50's. Las primeras investigaciones o comunicaciones del uso de la IA. Fue en el año de 1780, por el fisiólogo italiano Lázaro Spallanzani, realizado en perras. Existen reportes de que los árabes utilizaban la inseminación siglos antes (año 1300 d.C.) para la fecundar yeguas con semen robado de garañones.

En 1782, P. Rossi y Branchi, repitieron con éxito el experimento de Spallanzani. En 1803, el mismo L. Spallanzani informó que los espermatozoides enfriados con nieve no morían, sino que solo se tornaban inmóviles y que exponerlos al calor recuperaban la motilidad por varias horas.

A partir de esta última fecha no hubo comunicados adicionales sobre la inseminación artificial a finales del siglo, entre 1884 y 1887 Everett Milais inseminó 19 perras de las cuales -; quedaron gestantes. En 1897, Wealter Heape, en Inglaterra, trabajó sobre la Inseminación Artificial en perras y concluyó que un solo eyaculado podría servir para varias perras y que la inseminación podría ser una herramienta valiosa para estudiar los factores genéticos.

Al principio del siglo XX (1900) en Rusia se empezó a aplicar la IA en los animales de granja, siendo E.J. Ivanoff el que empezó a trabajar con caballos, bovinos y ovinos obteniendo mejores resultados en las dos últimas especies.

En 1936, Sorensen y Glylling-Holm organizaron la primera cooperativa de IA. En Dinamarca y en el año de 1952 alrededor del 55% de las vacas de ese país Eran inseminadas artificialmente. En Estados Unidos de Norteamérica, la primera cooperativa de IA. Se estableció en el año de 1938, siendo uno de los pioneros el profesor E. J. Peny.

Desde que Lazzaro Spallanzani en 1787 realizó la primera Inseminación artificial (IA) con semen fresco en caninos, este procedimiento ha sido aplicado y desarrollado a través del tiempo en la reproducción de pequeños animales. Ya en 1776 Spallanzani había observado que las bajas tem- peraturas provocaban una reducción reversible de la actividad metabólica de los espermatozoides, lo cual permitía almacenarlos Andersen, K. 1980 . Fue en 1956 que Harrop logra la primer preñez con semen refrigerado Atelo, R. 1998 abriendo las puertas a la criopreservación. Posteriormente, en 1969, se comunica por primera vez una IA satisfactoria con semen congelado Concannon, p. 1998.

Con el avance de la biotecnología, cada vez es más frecuente el uso de IA tanto para realizarla con semen fresco como con semen criopreservado. El estado de salud y nutrición de

los reproductores, así como el manejo del momento de inseminación, semen utilizado y técnica de inseminación determinarán el éxito o fracaso de la IA. La misma permite la interacción de dos reproductores cuando no se puede llevar a cabo el servicio natural, optimizar el uso de semen de buena calidad (inseminando a 2 o más perras con un mismo eyaculado) y utilizar semen criopreservado. La IA con semen refrigerado o congelado permite trabajar con dos reproductores en localizaciones geográficas distantes sin necesidad de transportarlos, lo cual brinda grandes ventajas para los criadores. Así mismo la congelación de semen en caninos se encuentra en constante estudio y desarrollo debido al creciente interés de criadores y teriogenólogos. Este método de crío preservación hace posible el uso de reproductores mucho después de finalizado su período útil como semental y la conservación del material genético del macho siendo esto último de gran importancia en cánidos silvestres en peligro de extinción.

El objetivo de este trabajo fue analizar los factores que condicionan el éxito de la IA y la posibilidad de realizarla con semen refrigerado en condiciones naturales .

### **Antecedentes.**

En nuestro país cada vez se esta volviendo mas popular la inseminación artificial en caninos con semen fresco. Hay determinadas razas que por sus características morfológicas o por preferencia de los criadores están utilizando la inseminación artificial como método de rutina.

El primer informe sobre el uso de la inseminación artificial en animales domésticos data de 1780, cuando el abate y fisiólogo italiano Lázaro Spallanzani obtuvo cachorros después de inseminar una perra con semen fresco (Heape, 1897). En la actualidad y dado que la reproducción y crianza de perros es una afición de distribución mundial, la preservación de semen y la inseminación artificial en la especie canina se ha constituido en tema de alto interés para los médicos veterinarios y criadores de perros de muchos países (Sánchez, 1998).

Si bien la inseminación artificial en las especies de interés zootécnico, es una biotecnología usada principalmente con el objeto de reproducir el mejor material genético (Mc Donald, 1975), en la especie canina representa además una herramienta clínica.

Feldman y Nelson (1996) y Sánchez (1998) destacan algunas de las aplicaciones clínicas de la inseminación artificial en perros, en las cuales la preservación y transporte de semen serían fundamentales.

1. Hembras nerviosas o con problemas de conducta, que rehusan el apareamiento o se comportan de manera agresiva con el macho.
2. Hembras con vagina estrecha, lo que dificulta la penetración y origina dolor, motivo por el cual la perra rehuye el apareamiento.
3. Machos con rigidez o debilidad de las extremidades posteriores.
4. Machos en los cuales la erección del pene ocurre demasiado temprano, imposibilitando la penetración debido al engrosamiento del bulbo del glande.
5. Machos de menor tamaño que las hembras, lo cual imposibilita la monta.
6. Reproductores separados geográficamente de la hembra en el período de estro.

No obstante que varios trabajos han entregado una basta información acerca de la manipulación, preservación e inseminación artificial con semen canino fresco, refrigerado y congelado (Gill y col., 1970; Farstad, 1984; Tsutsui y col., 1988; Linde-Forsberg y Forsberg, 1989; Linde-Forsberg y Forsberg, 1993; Linde-Forsberg, 1994; Linde-Forsberg, 1995; Rota y col., 1995; Antelo, 1998), en Chile no se registran antecedentes sobre el uso de inseminación artificial en la especie canina. Por esta razón el propósito de este trabajo es evaluar la capacidad fecundante de espermatozoides caninos conservados a temperatura de refrigeración y empleados en inseminación artificial.

El método consiste en la recolección manual de semen y posterior depósito en la vagina de una perra en celo. La razón principal por la cual se debe recurrir a este método es la imposibilidad de realizar un apareamiento natural entre una hembra y un macho. Las causas en la hembra comprenden: características raciales, anomalías congénitas (no hereditarias) o adquiridas, falta de aceptación al macho, estrecheces vaginales, dolor,

debilidad del tren posterior, trastornos psicológicos, etc..Por parte del macho, el servicio natural puede verse dificultado por defectos de la conformación que impiden la penetración o el abotonamiento, artritis, dolores de columna vertebral, debilidad del tren posterior, erección prematura, que imposibilita la correcta penetración, problemas psicológicos, como timidez, inexperiencia, falta de libido, etc.

La inseminación artificial previene la diseminación de enfermedades infecciosas evitando que los ejemplares de alto valor reproductivo sean expuestos a estos riesgos.

En la especie bovina hace años que se está utilizando la congelación de semen con el fin de difundir ampliamente la genética de animales superiores. Debido a que el semen del perro carece de la concentración suficiente para dividir un eyaculado en muchas dosis, hasta hace poco tiempo no se le había dado importancia a su congelación.

La utilización de semen conservado permite la mayor dispersión de rasgos genéticos deseables, prevención de enfermedades, disminución de costos al no tener la necesidad de transportar los animales, reducir los peligros de embarcar un perro y evitar el stress del transporte.

La ventaja adicional del congelado del semen es la posibilidad de conservar por mucho tiempo (años) la genética de un determinado ejemplar, aun mucho después de haber fallecido, posibilitando la reutilización de sus genes varias generaciones después de su desaparición, cuando sus características genéticas comienzan a diluirse y desaparecer. En presencia de enfermedades terminales no hereditarias, cuando se sabe a ciencia cierta que un ejemplar va a morir a corto plazo el almacenamiento de su semen permite al criador continuar utilizando su perro aun después de muerto sin alterar su plan de crianza. Así mismo permite que destacados progenitores puedan ser utilizados en forma más extensiva. Sánchez (1998)

Se puede utilizar la inseminación artificial en tres formas diferentes:

1-semen fresco: es el procedimiento mas utilizado por criadores y veterinarios que consiste en la extracción manual del semen y su inmediato depósito en la vagina de la perra.

2- Semen refrigerado consiste en realizar una dilución del semen y su refrigeración a 5 grados centígrados que permite preservar a corto plazo ( al rededor de 24 a 48 hs) la viabilidad espermática. El diluyente ayuda a proteger las membranas de los espermatozoides de los daños provocados por cambios en la temperatura y por las sacudidas durante el transporte. Esto nos da todas las ventajas del transporte del semen y la inseminación a distancia y permite evitar el daño que se produce en los espermatozoides al congelarlos, siendo generalmente los resultados de preñez algo mejores que los obtenidos con semen congelado.

3- Semen congelado: consiste en realizar una dilución del semen y su posterior congelación que permite su conservación por años. es una preservación a largo plazo, que permite obtener todas las ventajas genéticas anteriormente citadas.

Se han realizado infinidad de estudios sobre el semen congelado, variando la composición de los diluyentes, la velocidad de enfriamiento, y la presentación final del semen.

El semen suele congelarse en pajuelas o pastillas .actualmente se prefieren las pajuelas, por su facilidad de identificación y almacenamiento.el numero de dosis inseminantes que puede obtenerse, de una sola extracción varia con la calidad del semen, pudiendo lograrse entre 0 y 5 dosis por eyaculado.

Durante el proceso de congelado, el semen sufre daños que disminuyen drásticamente el tiempo de supervivencia, de los espermatozoides, dentro del tracto genital femenino. A si mismo el pasaje a través del cuello del útero se ve dificultado. Esto hace que sea de gran importancia el depósito del semen directamente dentro del útero, ya que los porcentajes de concepción son muy superiores en la inseminación intrauterina que en la intravaginal profunda.

También es evidente necesario determinar con extrema precisión el momento fértil de la perra ya que el semen congelado vive solo de 12 a 24 hs. en contraposición con el semen fresco (de optima calidad) que puede vivir varios días en el tracto femenino. La determinación del momento de la ovulación debe ser establecido por citología vaginal, concentración de progesterona serica y vaginoscopia.

No obstante a pesar de las ventajas evidentes del método el uso del semen congelado provenientes de machos seleccionados de cada raza, representaría un considerable costo representado por gastos de congelación y almacenamiento del semen y los porcentajes de concepción y tamaño de las camadas algo menores que los obtenidos con semen fresco.

En 1981 el American Kennel Club aprobó el registro de camadas resultantes de inseminación artificial con semen congelado y el método se esta utilizando ampliamente en USA y en Europa.

El avance genético que podría lograrse con la utilización de semen congelado que provenga de machos fértiles y sanos de cada raza, representaría una gran adelanto a corto plazo en la zootecnia canina

## **REPRODUCCIÓN CANINA**

Vamos a describir algunos de los aspectos más interesantes sobre la reproducción de la especie canina, recordando aquellos puntos que puedan resultar problemáticos a la hora de cruzar nuestros perros. Comenzaremos señalando las características más significativas del ciclo reproductivo de la perra.

### **FISIOLOGÍA DEL CICLO ESTRAL**

Las perras alcanzan la pubertad, es decir el primer celo, entre los 6 y los 12 meses de edad no obstante, estos datos varían en función de la raza, ya que las razas más pequeñas aparecen en celo antes que las razas grandes.

Este celo se repite a intervalos de 4 a 12 meses, siendo lo más frecuente la aparición cada 6 meses.

El ciclo reproductivo de la hembra, lo podemos dividir en cuatro periodos: Anoestro, Proestro, Estro y Metaestro o Diestro.

## ANOESTRO

Es el periodo de reposo sexual, es decir, de inactividad ovárica. La duración es de unos 4 meses generalmente, aunque está influenciada por algunos factores.

Epoca del año. Olor a hormonas sexuales (ferormonas) Razas.

## PROESTRO

Los síntomas más iniciales son tumefacción de los labios de la vulva y aparece un flujo serosanguinolento. Dura de 7 a 10 días y durante el mismo, la hembra no acepta al macho, aunque resulta atrayente para estos. En algunas hembras este flujo casi no se aprecia porque lo eliminan lamiéndose, en otras es más copioso y aparente. En esta etapa, la emisión de orina es más frecuente para diseminar hormonas sexuales (feromonas).

## ESTRO

Es el periodo en el cual se produce la ovulación y la hembra acepta al macho. La vagina esta engrosada, los pliegues vaginales se hacen angulosos al disminuir los estrógenos y aumentar la progesterona.

Según las hembras puede variar el tiempo en que tardan los folículos en desarrollarse y que se produzca la ovulación, puede suceder que:

La ovulación sea temprana (a los siete días del proestro).

La ovulación sea tardía (hasta os 20 días del proestro, la perra seguiría siendo receptiva hasta ese momento).

El momento de la ovulación puede no ser constante durante los celos sucesivos de una misma perra.

La ovulación tiene lugar generalmente durante un periodo de 72 horas.

## METAESTRO

La hembra rechaza el coito por primera vez y dura unos sesenta días. La vulva disminuye de tamaño y puede verse en ocasiones un flujo mucoso,

parecido al que aparece en la gestación. No hay manifestaciones clínicas que señalen el final, al pasar esta etapa comenzaría el periodo de Anoestro (reposo sexual) y así sucesivamente.

## DETERMINAR EL MOMENTO ÓPTIMO PARA LA RECUBRICION

La mayoría de las perras son cubiertas a los 12 días, después del inicio del proestro y suele dar buenos resultados, pues aunque no esté ovulando en ese mismo momento, el esperma del macho puede vivir hasta siete días en el aparato genital de la hembra.

Las cubriciones repetidas con un intervalo de 24 a 48 horas, aumenta la probabilidad de concepción.

Es recomendable detectar el momento de la ovulación, pues hay hembras que ovulan antes y otras después y sobre todo es importante saberlo en los siguientes casos:

- Se va a realizar inseminación artificial.
- El perro posee un semen de baja calidad.
- La perra no se deja cubrir y necesita sujeción.
- El macho se encuentra a muchos Kilómetros y sólo se va a realizar una monta. Antelo, R. 1998.

Existen varias técnicas para determinar este momento:

Midiendo en plasma los niveles de hormonas luteinizante (LH).

La mayoría de las ovulaciones ocurren de 24 a 48 horas después de que la LH alcanza su nivel máximo en plasma.

Midiendo la concentración de progesterona en sangre.

Realizando frotis vaginales diarios, en estos se observan los cambios celulares que se producen. Se realiza el primer frotis, unos 10 días después de observar las manifestaciones iniciales de proestro, ya que algunas perras pueden estar próximas a ovular en este momento.

La ausencia de neutro filios y la queratinización de la mayoría de las células epiteliales junto con la presencia de muchas bacterias, indican que el apareamiento se realizará en dos días. Los óvulos no son fertilizados con

facilidad hasta 3 días después de la ovulación y como el esperma del macho puede vivir varios días en el aparato genital de la hembra, en este periodo en que va a ser cubierta es menos copioso, pero en ocasiones persiste un flujo sanguinolento hasta el final del estro. Antelo, R. 1998.

## FACTORES QUE IMPIDEN EL APAREAMIENTO NORMAL

Psicológicos: La mayoría de los perros saben instintivamente realizar la cópula, aunque en algunos casos sean incapaces debido a:

Diferencias en las experiencias sexual; un macho experimentado puede asustar a una hembra que realiza su primer apareamiento o al contrario.

Falta de familiaridad con el lugar; como el macho es el que realiza el papel más activo en la cópula, es aconsejable trasladar a la hembra a donde se encuentra el macho.

Hembras excesivamente "humanizadas" que en rara ocasiones ven perros y manifiestan rechazo a la aproximación de estos.

Físicos: Perros con musculares u óseas excesivamente pesados, etc. En el caso de que la monta natural no se pueda realizar, debemos recurrir a la inseminación artificial.

## INSEMINACION ARTIFICIAL CON SEMEN FRESCO

Recogida del semen: estando presentes el macho y la hembra, se deja que el macho olfatee la hembra y antes de que intente montarla se sujeta el pene de este, se expone el bulbo del glande y se presiona la base de este.

La eyaculación se compone de 3 fracciones:

- La 1ª fracción es clara y no hay espermatozoides.
- La 2ª fracción es rica en espermatozoides y la que nos interesa en la inseminación.
- La 3ª fracción se desecha.

La muestra de semen debe analizarse previamente para asegurar que el perro es fértil. Farstad, w. 1984

Para cada inseminación se utiliza un eyaculado. Si se produce retraso entre la recogida y la inseminación, no se debe enfriar el semen, deberá

efectuarse en un plazo de 15 minutos.

Las tasas de gestación son del 50% aproximadamente.

Existen también técnicas de inseminación con semen refrigerado o congelado, pero no suelen realizarse con demasiada frecuencia y no hablaremos de ello en este capítulo.

**Inseminación:** Se introduce un catéter de plástico en la vagina de la hembra y se dirige manualmente al interior, pues la vagina de la perra es relativamente larga.

Se levantan del suelo las extremidades posteriores de la perra y con una jeringuilla se introduce el semen. Se estimula el vestíbulo de la perra con un dedo lo que provoca contracciones vaginales que ayudan a pasar el semen hacia el interior del útero.

Se mantiene en esta posición unos minutos y luego se deja de nuevo en pie, evitando que orine. Se aconsejan dos inseminaciones en días alternos.

La inseminación artificial tiene muchas ventajas cuando no puede realizarse la monta natural, debe ser realizada por un veterinario conocedor del tema. Farstad, W. 1984

## **DIAGNOSTICO DE GESTACION**

Consideramos como momento del inicio de la gestación el día de la monta, aunque esto es fisiológicamente erróneo, ya que esta comienza varios días más tarde de la monta.

Las pruebas que podemos realizar para confirmar la gestación son:

### **Palpación abdominal:**

Podemos palpar pequeños abultamientos a partir del día 21 según avanza la gestación, estos abultamientos se van haciendo mayores y situados más ventralmente, a partir del día 35 ya no es posible la identificación de los conceptos individualmente debido a cambios anatómicos en el útero.

**Ecografía** es uno de los métodos más fiable y podemos dar diagnósticos a los 21 - 23 días.

**Ultrasonidos Doppler:** proporciona un sonido de ladrido fetal. No es seguro hasta los 45 días.

**Radiografía:** Realizada antes del día 35, resulta altamente peligrosa para los

embriones. A partir de los 45 días la mineralización de los esqueletos fetales ya es evidente y se puede determinar el número de cachorros.

Auscultación de los corazones fetales con un fonendoscopio permite el diagnóstico avanzada la gestación. Farstad, W. 2000

## **PARTO**

Debemos colocar a la hembra en un lugar tranquilo y libre de corrientes de aire, con una temperatura aproximada de unos 30°C. Notaremos que comienza el parto porque encontraremos a la hembra inquieta y jadeante, aunque podemos hacernos una idea mejor del momento del parto midiendo la temperatura rectal 3 veces al día, generalmente, cuando la temperatura baja de 37.5 °C, el parto comenzará a las 24 horas siguientes. Una vez comienza el parto, debemos vigilar que los cachorros vayan naciendo con normalidad y la perra vaya rompiendo la membrana amniótica en la que aparece envuelto, ya que de lo contrario se ahogará. Posteriormente, cortará el cordón umbilical y lamerá al cachorro para secarlo y estimular su respiración. El tiempo que puede transcurrir del nacimiento de un cachorro a otro es muy variable, pudiendo pasar más de 6 horas. Como norma, podemos considerar que 30 minutos de contracciones abdominales sin resultados puede indicar la existencia de algún problema y se debe recurrir al veterinario. Farstad, W. 2000

## **ÉXITO O FRACASO DE LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL**

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. 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. Farstad, W. 2000

## **II.- Ventajas y Desventajas de la Inseminación Artificial**

### **Ventajas**

- 1) El uso de sementales sobresalientes ofrece la oportunidad de mejorar genéticamente los animales del hato.
- 2) potencial reproductivo de un semental se incrementa, es decir, si un perro por monta natural puede cubrir un determinado número de perras por año, a través de la IA y con el uso de semen congelado se pueden cubrir el doble o triple de perras por año.
- 3) Con uso de la IA se puede probar rápidamente el potencial productivo y reproductivo de un semental. Este se puede evaluar sobre un grupo de cachorros en una sola generación, mientras que por monta natural se utilizara demasiado tiempo incluso toda la vida del semental.
- 4) Se reducen los riesgos de transmitir enfermedades de dos formas: a) las organizaciones de IA llevan un control estricto de enfermedades no procesando el semen de animales enfermos y b) se usa a través del uso de antibióticos que se incorporan durante el proceso del semen.
- 5) se pueden utilizar sementales valiosos que debido a una lesión física no pueden copular. Se ha observado que algunos perros quedan incapaces para copular después del transporte, peleas con otros perros o por algún accidente.
- 6) pueden ser servidas hembras jóvenes o de talla pequeña por otros grandes o pesados sin temor de lastimarlas o por el contrario, en ocasiones se pueden emplear sementales jóvenes o pequeños de talla para realizar la copula.
- 7) se puede mejorar el control de registros, cubriciones y nacimientos. Asimismo se mejora el nivel de manejo, ya que para garantizar el éxito de la IA es necesario llevar un buen sistema de registro lo que permite mejorar la selección de los animales que van a participar en la IA ya que no deben entrar animales mal nutridos ni enfermos.
- 8) A través de la AI se puede cubrir un gran número de perras (15,20 o más) en un mismo día, cosa que sería muy difícil en condiciones naturales para un solo perro.
- 9) La inseminación artificial permite la prueba de perross en forma más confiable y segura.

### **Desventajas**

1. La utilización de un perro no probado ni estudiado en cuanto a sus características genéticas, puede traer como consecuencia pérdida o una disminución en la producción de cualquier explotación.
2. Se necesita personal capacitado para el manejo del semen, la inseminación y además para una adecuada detección de los animales en celo.
3. Al iniciar un programa de IA en una explotación la inversión monetaria es alta (compra de equipo, instalaciones, etc.).
4. Las enfermedades (tumor venéreo) pueden propagarse con gran rapidez de perros que no se les lleva un control sanitario estricto. La adición de antibióticos en el diluyente, no es suficiente para controlar todas las enfermedades que pueden ser transmitidas por el semen.

5. Si no se tiene un buen manejo del termino (nivel de nitrógeno o de las de semen (descongelación) se puede reducir (e incluso llegar a cero) el porcentaje de concepción.

### **Estado de salud y nutrición de los reproductores**

La reproducción es una función altamente especializada y es preciso lograr el exacto equilibrio entre la sanidad y la nutrición para que el animal pueda expresar completamente su capacidad reproductiva.

La aplicación de IA en animales sanos, fértiles y adecuadamente alimentados hará posible aumentar las posibilidades de éxito, no solo en lograr una preñez, sino también una camada de alto número de cachorros.

Utilizar IA en una hembra con alguna afección orgánica o un inadecuado aporte nutricional que comprometa su fertilidad, sólo significará un mal aprovechamiento de recursos y tecnología. SÁNCHEZ, A. 2000

### **Detección del momento de mayor fertilidad de la hembra**

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.

En los caninos la duración del proestro es variable, pudiendo oscilar entre 2 y 25 días. La ovulación ocurre aproximadamente 48 horas luego de ocurrido el pico preovulatorio de hormona luteinizante (LH), al inicio del estro. El oocito es ovulado al comienzo de la primera división meiótica, la maduración se completa en el oviducto y requiere aproximadamente 2 días (4). Las particularidades fisiológicas de los caninos dificultan la estimación del momento de mayor fertilidad de la hembra sin el uso de métodos complementarios. SÁNCHEZ, A. 2000

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 a medida que se acerca el fin del proestro y el comienzo del estro. Stornelli. A., y col. 2001

El estudio de extendidos vaginales seriados desde el comienzo del proestro nos permitirá, junto con la imagen vaginoscópica, aproximar el comienzo del estro, Farstad, W. 2000.

Sin embargo no podremos identificar exactamente el momento de mayor fertilidad de la hembra. Feldman, E. R. Nelson. 1996.

El dosaje de progesterona sérica hará posible determinar el momento de la ovulación a través de la estimación indirecta del pico de LH. La progesterona asciende de niveles basales (0,5 ng/ml) a niveles superiores  $\geq 2$  ng/ml cuando ocurre el pico preovulatorio de LH. El dosaje sérico de LH es el método más exacto para identificar el pico de LH. Sin embargo, debido al costo, este método no se utiliza rutinariamente Farstad, W. 2000.

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 Concannon PW. et al., 1997, 1997, Los óvulos permanecerán capaces de ser fecundados por 4 o 5 días, momento en el cual realizaremos la IA. Si trabajamos con semen congelado el momento indicado para realizar la IA será entre 72 y 96 horas luego de la ovulación Concannon PW., 1975.

### **Tipo, manejo y calidad del semen utilizado.**

El conocimiento de la calidad de semen de un reproductor nos permitirá estimar las probabilidades de éxito en la utilización del mismo para realizar IA con semen fresco o criopreservado. En el perro la información disponible sobre la relación entre calidad del semen y fertilidad es escasa comparada con otras especies. Se ha estimado que la cantidad mínima de espermatozoides necesarios para preñar una hembra es de 150 a 200 x10<sup>6</sup> (12, 13, 14). Sin embargo se han comunicado preñeces con 20 x 10<sup>6</sup> de espermatozoides depositando quirúrgicamente semen fresco en la porción proximal del cuerno uterino y dos dosis de 30-35x 10<sup>6</sup> de espermatozoides realizando IA intrauterina por medio de cateterización cervical con endoscopio, Wilson M., 1993. La significación de las alteraciones morfológicas de los espermatozoides es otro parámetro muy poco estudiado. Algunos autores han comunicado que los defectos espermáticos primarios y secundarios no deben exceder el 30 o 40 %, Oettlé EE. 1993. Si bien la relación entre el tipo de defecto y fertilidad no ha sido establecida, se ha observado pérdida de la capacidad fecundante asociada con la presencia de gota citoplasmática proximal. 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 Morton DB et al., 1989.

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 (20). En el semen congelado la motilidad espermática luego del descongelado es el mejor indicador de fertilidad (19). Johnston SD. Et al., 1991.

La adición de Royal Jelly a diluyentes con Equex STM paste parece tener efectos sinérgicos en la viabilidad espermática al descongelado. Kong IK, et al., 2001.

Se han encontrado efectos benéficos en la adición de Orvus ES paste al diluyente, tanto en la protección acrosómica como en el porcentaje de espermatozoides móviles al descongelado Tsutsui T., et al 2000. El semen de baja calidad se relaciona no sólo con bajas tasas de preñez sino también con producción de camadas de escaso número de cachorros (11, 23, 24) England GCW, et al., 1989. Fosberg CL.1991.

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. En nuestro país la IA con semen fresco se realiza ocasionalmente, no utilizándose en la práctica reproductiva diaria la IA con semen refrigerado y/o congelado. Considerando la baja complejidad necesaria para la realización de esta técnica 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 en nuestro país. Sin embargo, el trabajo realizado en el área indica que en un futuro cercano estará disponible en México la posibilidad de acceder a bancos de semen congelado.

### ***IA con semen fresco***

La IA con semen fresco es una práctica sencilla y poco costosa que puede implementarse sin inconvenientes en la clínica reproductiva diaria.

La utilización de IA con semen fresco brindará resultados comparables (tasas de preñez y tamaño de la camada) con los obtenidos mediante servicio natural. England GCW, et al., 1989. Fosberg CL.1991. Fosberg CL.1996.

En un estudio realizado con 422 hembras, luego del servicio natural, realizado en el momento de mayor fertilidad, se obtuvo una tasa de preñez del 84.4 % (23). Por otra parte implementando IA con semen fresco se obtuvo un porcentaje de preñez de 83,8 % . Morton DB, et al., 1989.

La obtención de semen se realiza rutinariamente por masturbación, aunque puede utilizarse electro eyacuación en animales muy agresivos o en los que no logran eyacular por la técnica manual. 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. Una vez colectado en un recipiente adecuado, el semen es aspirado con una jeringa y depositado inmediatamente luego de la extracción en la vagina craneal, mediante una sonda de longitud variable según el tamaño de la hembra. Ettinger SJ, Feldman ER. 1995. Es muy importante asegurarse que se ha obtenido un eyaculado de buena calidad mediante la evaluación de la concentración y motilidad espermática a través de la observación rápida de una alícuota de semen separada con este fin

todo el material utilizado para la recolección, así como el usado para la IA debe ser estéril y libre de sustancias químicas contaminantes que puedan afectar la calidad del eyaculado. También es necesario que el material se encuentre a 37 °C para evitar el shock térmico de los espermatozoides . Johnston SD,1991.

Mediante IA con semen fresco se podrá obtener descendencia cuando no es posible realizar servicio natural por diferentes causas pudiendo ser aprovechados estos animales como reproductores. Esta práctica no debe ser llevada a cabo cuando la imposibilidad del servicio se relacione con problemas de transmisión hereditaria.

### **IA con semen refrigerado**

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. Watson PF. 1995. 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. Lardy HA, Philips PH.1989, y Marshall F, Hugh A. 1990. Los antibióticos agregados a los diluyentes evitan la proliferación bacteriana, en especial en los que contienen yema de huevo, Rota A, Strom B, Fosberg CL, 1995. Para la conservación de semen a 4 °C han sido usados diferentes diluyentes. Dentro de los 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, Morrow DA. 1980, Kirk RW. 1989. Algunas experiencias realizadas *in vitro* encuentran mejor conservación del semen en TYH, Stornelli MA, Stornelli MC, 2001. Rota A, Strom B, Fosberg CL. 1995. 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 % (24). Se han logrado buenos resultados *in vitro* almacenando y conservando semen canino diluido en MR-A® (Kubus SA, España) -yema de huevo a 4 y 15 °C . Stornelli MA, Stornelli MC, 2001. Rota A, Strom B, Fosberg CL. 1995.

Las mejores tasas de preñez obtenidas utilizando semen refrigerado se lograron con diluyentes realizados con tris/yema de huevo (62,5 %) y yema de huevo/crema (51,1 %). Fosberg CL.1996.

Para la refrigeración se colecta la fracción espermática del semen y se la 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 24-48 h. Fosberg CL. 1996.

Previo a la IA el semen refrigerado debe alcanzar lentamente la temperatura ambiente. Fosberg CL. 1996.

La utilización de semen refrigerado con diluyentes protectores como el tris-buffer con el agregado de 20 % de yema de huevo permite conservar espermatozoides con buena capacidad fecundante por un período de tiempo suficiente para trasladar el semen e inseminar animales ubicados en localizaciones geográficas distantes. Esto hace posible la IA de una hembra con el

semen de un macho que se encuentre en otra provincia u otro país limítrofe o cercano con mínimo gasto y baja complejidad de manejo. De esta manera se amplían las posibilidades de uso de un reproductor, permitiendo la comercialización de semen y facilitando el intercambio genético entre diferentes establecimientos. La simplicidad de manejo del semen refrigerado y su bajo costo, lo convierten en una excelente opción para nuestro país.

### ***IA con 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. England GCW. 1993 Smith FO.1986. Morton DB, Bruce SG. 1989. Sin embargo el uso de semen congelado puede implementarse respetando algunas normas básicas manejo y descongelado del mismo.

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 y almacenar semen en épocas en las cuales el reproductor no sea requerido para servicios.

Así mismo un banco de semen puede constituir un importante reservorio genético para la cinefilia y la conservación de razas en las que la población pueda disminuir drásticamente en el futuro.

El semen canino puede congelarse en pastillas o pajuelas 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 Nothling JO, Volkman DH.1997. Dobrinski I, Lulai C, Barth AD, Post K.1993.

Controles periódicos del termo de almacenamiento que aseguren un volumen de nitrógeno que permita una buena conservación del semen y una reducida exposición del mismo a temperatura ambiente fuera del nitrógeno durante el manejo de pajuelas o pastillas permitirá conservarlo en buenas condiciones para su posterior uso.

Cada tipo de almacenamiento (pastillas, pajuelas) requiere diferentes condiciones de descongelado. Las pastillas se descongelan a 37 °C utilizando usualmente solución salina de cloruro o citrato de sodio como diluyente. Las pajuelas de 0,5 ml se descongelan en baño térmico a 37 °C durante 1 minuto o a 75 °C durante 6 segundos, mientras que las mini pajuelas (0,25 ml) deben descongelarse a 75°C durante 5 segundos Kirk RW. 1989. Smith FO. 1986.

La mayoría de los autores logran mejores resultados utilizando inseminación intrauterina (mediante laparotomía, laparoscopia o cateterismo cervical) para el uso de semen congelado Fosberg CL. 1991. Stornelli MA, Stornelli MC, 2001. Los porcentajes de preñez obtenidos con el uso de inseminación intrauterina varían entre 60% y 90 %. Dumond C, Fontbonne A. 1993. Wilson M. 1993. Nothling JO, Volkman DH. 1995. Silva LDM, et al., 1996. Fosberg CL, Strom B, Govette G. 1999. Los resultados obtenidos por los diferentes autores son muy variables, esto puede explicarse por la variabilidad existente entre diluyentes, envasado y metodología de congelación y descongelación utilizadas (Tabla I).

Por otra parte, la técnica de inseminación intrauterina utilizada varía con la disponibilidad de material, equipos y entrenamiento de cada especialista Fosberg CL. 1991. Silva LDM, et al., 1996. Fosberg CL, Strom B, Govette G. 1999. Nothling 1999. informa buenos resultados (87,5 % de preñez) con el uso de IA intravaginal mediante el agregado de fracción prostática al semen luego del descongelado. Hasta el momento, esta experiencia no ha sido repro-ducida por otros autores con éxito. El tamaño de camada promedio alcanza valores entre 2,8 y 5,4 utilizando IA transcervical, Fosberg CL, Strom B, Govette G.1999. Günzel-Apel AR. 1999. Szász F, Gábor G, Solti L. 2000 4,8 mediante la aplicación de IA intrauterina quirúrgica Günzel-Apel AR. 1999 y 4,6 IA vaginal Nötling JO, Gerstenberg C, Volkman DH. 1995. 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.

El uso de semen con bajo porcentaje de espermatozoides viables al descongelado y las fallas en la determinación del momento de mayor fertilidad son dos factores críticos cuando se trabaja con semen congelado Watson PF. 2000. Salamon S, Maxwell WMC. 2000. Fastard W. 1984. . Fastard W, Andersen-Berg K. 1989.

El proceso de congelación – descongelación resulta en una reducida fertilidad comparada con la del semen fresco. Se ha comprobado que esto resulta de una combinación tanto de pérdida de viabilidad como de daño de la población espermática sobreviviente. 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 convierten en incapaces de fecundar Watson PF 2000. Por lo tanto la IA debe ser realizada con un número de espermatozoides vivos y competentes al descongelado, suficientes para obtener una alta probabilidad de fertilización. 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 la conforman (15). En el perro se estima que 200 X10<sup>6</sup> espermatozoides viables al descongelado son necesarios para obtener tasas aceptables de preñez Jhonston DJ, Kuztritz MVR, Olson P. 2001.

En la clínica reproductiva, el semen congelado es usado frecuentemente en Estados Unidos, ocasionalmente en Europa y muy raramente en Sud América; sin embargo la aplicación de esta biotecnología se encuentra en amplio desarrollo.

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, equipamiento, infraestructura y entrenamiento del operador, su utilización mediante IA 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 diario.

## Técnicas de inseminación

En el servicio natural el macho realiza la eyaculación dentro de la vagina de la hembra. En la IA el depósito del esperma 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. Esto fue demostrado claramente en los ovinos, especie en la cual la IA intrauterina requiere una dosis inseminante 10 veces menor que la cervical posterior. Watson PF.2000.

Cuando se trabaja con semen fresco se utiliza IA intravaginal, reservando la vía intrauterina cuando se trabaja con semen hipospérmico. 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, Silva LDM, Onclin K, Lejeune B, Vestergen JP. 1996. Aunque algunos autores obtienen buenos resultados con IA intravaginal Fosberg CL, Strom B, Govette G.1999.

**Tabla I:** Porcentajes de preñez en la perra obtenidos realizando IA con semen congelado

Autor	Volumen de pajuela	Técnica De IA	Porcentaje de preñez	Tamaño promedio de la camada
Silva 1996	0.5 ml	IA UL	60	SD
Nothling1997	0.25 ml	IAV	100	9
Nothling 1993	0.25 ml Frac.prost	IAVCFP IAVSFP	92.9/100 60	9.3 10.7
Fastard 1984	0.5 ml	IAUT	64-69	SD
Fosberg 1995	0.5 ml	IAV IAUN	40-80 83-91	4 5.4
Fontbone 1993	0.5 ml	IAV IAUT	52.6 73.6	4.2 5.5
Wilson 1993	0.5 ml	IAUT	80	5

Inseminación artificial vaginal: IAV; Inseminación artificial vaginal con fracción prostática: IAVCFP Inseminación artificial vaginal sin fracción prostática: IAVSFP; Inseminación artificial uterina laparoscópica: IAUL ; inseminación artificial uterina cateter noruego: IAUN; inseminación artificial uterina transcervical: IAUT; no se informa el dato en el trabajo de referencia: SD

### ***Inseminación artificial intravaginal***

En la IA intravaginal el semen será depositado en la vagina craneal la hembra mediante un catéter de longitud acorde al tamaño del animal.

La vagina de la hembra canina es de una longitud apreciable (10 a 12 cm en una Beagle de 10 kg de peso), y varía enormemente con la raza considerada. Es así que el tamaño de los catéteres también tendrá gran variación.

El catéter se introducirá a través de los labios vulvares, evitando la fosa del clítoris, dirigiéndose primero hacia dorsal para luego dirigirse hacia craneal adecuándose a la anatomía de la hembra canina. Una vez que el catéter se encuentra en el fondo de la vagina, el semen es impulsado a través de él mediante una jeringa y depositado en vagina craneal. Luego el catéter es retirado y la hembra es mantenida 10 a 15 minutos con el tren posterior sobreelevado .  
Ettinger SJ, Feldman ER.1995.

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.  
Marshall F, Hugh A.1990.

### ***Inseminación artificial intrauterina***

La inseminación artificial intrauterina puede realizarse depositando el semen en el útero, a través de la cateterización de cérvix o 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, como se trató anteriormente, y de los equipos disponibles.

### ***Inseminación artificial intrauterina transcervical***

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 denylon (catéter Noruego).

Con la hembra en estación, 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. La cateterización del cuello puede realizarse visualizando el cérvix con ayuda de un endoscopio (16). Este método permite al operador visualizar el cuello facilitando la maniobra de cateterización uterina. La hembra no necesita sedación, el operador requiere cierto entrenamiento y el equipamiento posee un costo considerable.  
Fosberg CL. 1991.

## ***Inseminación artificial intrauterina quirúrgica***

Puede realizarse mediante laparotomía, con anestesia general o epidural. Se deposita lentamente el semen en el cuerpo o cuernos uterinos mediante una jeringa y una aguja calibre 21, con el bisel hacia arriba y una inclinación de 45 °C. 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. Held JP.1997.

Sin embargo, el costo de los equipos hace que esta técnica halla sido utilizada sólo ocasionalmente. Wildt DE. 1986.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Para este trabajo se ocupó un macho de un año y 3 meses (20 Kg) y una hembra de tres años (18 Kg), ambos de raza Bulldog Ingles, clínicamente sanos. El macho, dada su edad, no había sido usado como reproductor anteriormente y la hembra tenía un registro de 1 camada, con 6 cachorros.

***Evaluación de la hembra:*** Al cuarto mes después del último celo, la hembra fue controlada para observar el inicio del proestro a través de signos de actividad estrogénica, tales como edema vulvar y secreción sanguinolenta en la comisura ventral de la vulva (Johnston, 1995); además, un día a la semana, se obtuvieron frotis vaginales con tórula de algodón, los cuales fueron fijados con metanol, teñidos con tinción Giemsa y examinados con microscopio de luz directa a 100 x y 400 x (Sánchez, 2000). Una vez evidenciado clínicamente el inicio del proestro, los frotis fueron obtenidos diariamente, evaluando la cinética de la células superficiales ( $N^{\circ}$  de células superficiales /  $N^{\circ}$  de células totales x 100). Cuando el porcentaje de células superficiales fue superior al 80% la perra fue mantenida en confinamiento a fin de realizar un adecuado control del estro.

***Evaluación del macho:*** Al perro se le realizó un examen andrológico completo (Feldman y Nelson, 1996). Se obtuvieron muestras de semen por manipulación digital al momento del examen andrológico y al día siguiente, recolectándose sólo la segunda fracción del eyaculado). Las muestras seminales fueron evaluadas de acuerdo a la metodología propuesta por Díaz y Arancibia (1971) para la calificación de la fertilidad potencial de los animales domésticos; registrándose color, volumen, olor y características microscópicas como

porcentaje de motilidad progresiva, concentración espermática y porcentaje de espermatozoides vivos.

**Procesamiento del semen e Inseminación Artificial:** Después del análisis seminal, se procedió a la dilución del semen con un diluyente sobre la base de leche semi-descremada UHT<sup>1</sup> (0,5% materia grasa) y antibióticos: estreptomina<sup>2</sup> 50 mg/100 ml y penicilina sódica<sup>3</sup> 5 mg/100ml, el cual fue mantenido e incorporado al semen a una temperatura aproximada de 25°C (Sánchez y col., 1995). La dilución se hizo mezclando gradualmente 4 ml de diluyente por 1 ml de semen (Linde-Forsberg, 1995). Una vez finalizada la dilución se evaluó la motilidad progresiva bajo microscopio de contraste de fase con platina térmica a 37°C. El semen diluido se fraccionó en volúmenes de 4 ml en tubos de plástico cónicos<sup>5</sup> y puesto en un refrigerador a 5°C. El semen fue evaluado nuevamente para motilidad progresiva después de 24 y 48 horas de refrigeración.

Las inseminaciones comenzaron a realizarse al tercer día del estro citológico (> 90% de células superficiales en el frotis vaginal), repitiéndose 24 y 48 horas más tarde. Antes de la inseminación se retiró el semen del refrigerador y se dejó en adaptación por 30 minutos a temperatura ambiente (aproximadamente 20°C). Para depositar el semen en el fondo vaginal se usó un espéculo tubular de 15 cm, una pipeta de inseminación de bovino y una jeringa plástica de 10 ml. Inmediatamente después de la inseminación la región perineal fue masajeadada con el propósito de estimular el transporte espermático ( Andersen, 1980) y la perra mantenida con el tren posterior elevado en un ángulo de 60° por alrededor de 15 minutos a fin de evitar el reflujo del semen ( Farstad, 1984; Tsutsui y col., 1988). La concentración espermática empleada en cada inseminación fue de no menos de 600 millones de células espermáticas totales por dosis en un volumen que varió entre 5 y 8 ml

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El estudio del estro de la perra mediante la citología vaginal permitió evaluar indirectamente el aumento de estrógenos sanguíneos, medido por su efecto sobre el epitelio vaginal, aumentando la proporción de células de las capas superficiales (Johnston, 1995). La presencia de más de un 80% de células superficiales en frotis vaginales de perras reproductivamente sanas se puede considerar como estro (Shille, 1989; Wright, 1991). Este último aspecto

es de mucho interés, por cuanto la citología vaginal permite la detección de estrógeno en perras que no manifiestan signos externos y/o que rechazan la presencia del macho (Feldman y Nelson, 1996; Sánchez, 1998).

Las características macroscópicas y microscópicas de los eyaculados (cuadro 2), junto con el examen físico permitieron calificar satisfactoriamente al reproductor, especialmente al considerar que la motilidad progresiva alcanzó un 90% y que el promedio descrito en perros de un año de edad no supera el 65% (Tello y col. , 1988).

**Cuadro 1.** Características macroscópicas y microscópicas de los eyaculados caninos de perro Bulldog Ingles procesados para inseminación artificial.

---

<b><u>CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS</u></b>			
	<b>VOLUMEN</b>	<b>COLOR</b>	<b>OLOR</b>
<b>Eyaculado 1</b>	3ml	blanco	suis generis
<b>Eyaculado 2</b>	2ml	blanco	suis generis

---

<b><u>CARASTERISTICAS MICROSCOPICAS</u></b>			
	<b>Motilidad</b>	<b>Vitalidad</b>	<b>Concentración</b>
<b>Eyaculado 1</b>	(%)	(%)	(esp/mm2)
<b>Eyaculado 2</b>	90	90	338.000

---

Cabe destacar que la motilidad progresiva de los espermatozoides, inmediatamente después de la dilución, se mantuvo en 90% y en las evaluaciones posteriores a las 24 y 48 horas de refrigeración, los valores observados en ambos eyaculados fueron de 80 y 60 %, respectivamente. Estos valores son semejantes a los descritos por Rota y col. (1995), quienes empleando un diluyente en base a yema de huevo \_ TRIS, conservaron el semen diluido a una temperatura de 4°C, observando motilidades progresivas de 73,6 y 70,4 % a las 24 y 48 horas de refrigeración, respectivamente.

La manutención de buenos niveles de motilidad progresiva en el semen refrigerado con diluyentes en base a leche semi-descremada se puede atribuir a las características protectoras de la caseína y los fosfolípidos de la leche, biomoléculas capaces de estabilizar y regular la integridad de la membrana espermática frente al shock térmico (Varner y col. , 1988), condición que también poseen los fosfolípidos de la fracción lipoproteica de baja densidad de la yema de huevo (Cookson y col. , 1984).

Las características de las dosis de semen empleadas en esta experiencia se muestran en el cuadro 2, destacando que se inseminó con un promedio de 600 millones de espermatozoides totales por dosis, cantidad superior a la descrita en ensayos con semen fresco (Tsutsui y col. , 1988) y semen refrigerado (Gill y col. , 1970), quienes usando dosis de inseminación con 200 millones de espermatozoides móviles e inseminando intravaginalmente a perras Beagle, obtuvieron 100 y 80 % de preñeces, respectivamente.

**Cuadro 2. Características de las dosis de semen canino refrigerado empleados en inseminación artificial, en perros Bulldog**

Eyaculado	Tiempo de refrigeración		Espermatozoides	Espermatozoides
	No del Semen (hrs)		por dosis (x10 <sup>4</sup> )	moviles x dosis(x 10 <sup>4</sup> )
1 <sup>a</sup> inseminación	1	24	676,0	640,8
2 <sup>a</sup> Inseminación	1y 2	24 y 48	940,0	650,0
3 <sup>a</sup> Inseminación	2	48	630,0	380,0

5°C. El semen fue evaluado nuevamente para motilidad progresiva después de 24 y 48 horas de refrigeración.

Veintiocho días después de la última inseminación, se realizó el diagnóstico de gestación mediante palpación digital y ultrasonido. En dicha oportunidad se visualizaron vesículas gestacionales y latido cardiaco fetal (Inaba y col., 1984). Finalmente 61 días después de la última inseminación la perra parió 6 cachorros vivos.

Si bien el resultado de esta inseminación artificial fue satisfactorio, cabe señalar que lo óptimo en un programa de reproducción asistida en caninos es precisar el momento de la ovulación en la perra, ya que se sabe que los

mejores resultados de fertilidad, expresados en tasa de concepción y tamaño de camada, se logran cuando la hembra es cubierta o inseminada 2 a 3 días después de la ovulación (Linde-Forsberg, 1994; Concannon, 1998), lo cual se explica porque la ovulación en la perra ocurre con ovocitos primarios, vale decir con su núcleo en estado de vesícula germinativa, en la profase de la primera división meiótica (Tsutsui, 1989). La meiosis se reinicia un día después de la ovulación, generalmente en la porción media del oviducto. La maduración ovocitaria, implica que el gameto finalice la primera división meiótica e inicie la segunda, quedando detenido en la segunda metafase de la meiosis. Sólo después de la maduración (2 a 3 días) el ovocito está apto para ser fecundado (Farstad, 2000). Un buen recurso para evaluar si la ovulación ha ocurrido, es la determinación de progesterona plasmática o sérica, la cual debería comenzar a medirse a partir de la fase de proestro tardío (Linde-Forsberg, 1995).

Esta experiencia, de acuerdo a nuestros antecedentes, destaca la factibilidad de conservar semen canino por períodos superiores a un día mediante la dilución del semen en un medio adecuado y conservándolo a temperatura de refrigeración. Esto permitirá el desplazamiento de material genético entre ciudades dentro del país. Cabe señalar que el diluyente empleado es fácil de obtener, ya que se prepara con una leche larga vida semi-descremada comercial y, por otra parte, la refrigeración del semen en la actualidad no constituye un obstáculo

## **CONCLUSIONES**

Si bien la IA con semen fresco es una práctica usada rutinariamente en la reproducción de pequeños animales, no ocurre lo mismo con la IA con semen criopreservado (refrigerado o congelado). Sin embargo, el continuo estudio de los factores que posibilitan una mejor criopreservación de semen relacionados con los procesos de refrigerado, congelado y descongelado, posibilitarán en el futuro la aplicación frecuente de esa biotecnología.

La utilización de diluyentes que permitan conservar el semen canino a 4 °C, logrando altos porcentajes de espermatozoides vivos con motilidad progresiva e integridad acrosómica durante 2 a 5 días, hará posible el traslado de semen a diferentes puntos de nuestro país e incluso a países limítrofes o cercanos.

Esto evitará el traslado de animales para la realización de servicio natural, disminuyendo los costos y esfuerzo que esto implica. Es importante destacar que el proceso de refrigeración de semen canino es de bajo costo y fácil realización, pudiendo implementarse con mínimo equipamiento y moderado entrenamiento del operador. Por otro lado 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 de práctica privada brindar un nuevo servicio, aumentar sus ingresos y mejorar su práctica diaria.

Procesos adecuados de dilución, elección correcta del buffer y crioprotectores, tiempo suficiente de equilibrio, curvas apropiadas de congelado y descongelado, determinarán un porcentaje reducido de células con membrana espermática dañada y una mayor sobrevivencia de los espermatozoides en el tracto genital femenino. La conservación de la integridad estructural y de la fisiología espermática forma parte de los factores que permiten altos porcentajes de preñez y tamaño de camadas 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.

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, equipamiento, infraestructura y entrenamiento del operador, su utilización mediante IA 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.

## **Bibliografía**

Andersen, K. 1980. Artificial Insemination And Storage Of Canine Semen. En: Morrow, D. (Ed.). Current Therapy In Theriogenology, Diagnosis, Treatment And Prevention Of Reproductive Diseases In Animals. W.B. Saunders Co., Philadelphia, Pp. 661-665.

Antelo, R. 1998. Técnicas De Inseminación Artificial En Caninos. Curso Tópicos De Clínica Reproductiva E Inseminación Artificial En Caninos. Universidad Austral De Chile, Valdivia, Chile, Pp. 63-65.

Concannon, P. 1998. Physiology Of Canine Ovarian Cycles And Pregnancy. En: Advances In Canine Reproduction. Linde-Forsberg, C. (Ed.). Mini-Symposium. Uppsala, Sweden. Concannon Pw, Hansen W, Visek Wj. The Ovarian Cycle Of The Bitch: Plasma Estrogen, Lh And Progesterone. Biol. Reprod. 1975; 13:112-121.

Concannon Pw. Hansen W. McEntee K. Changes In Lh, Progesterone And Sexual Behavior Associated With Preovulatory Luteinization In The Bitch. Biol Reprod. 1977; 17:604-613.

Concannon Pw. A Review For Breeding Management And Artificial Insemination With Chilled Or Frozen Semen. Proceedings Of Canine Reproduction Symposium. September 1997. American College Of Theriogenologist. 1997; P.1-17.

Cookson, A., A. Thomas, J. Foulkes. 1984. Immunochemical Investigation Of The Interaction Of Egg-Yolk Lipoproteins With Bovine Spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 70: 599-604.

Dobrinski I, Lulai C, Barth Ad, Post K. Effects Of Four Extenders And Three Different Freezing Rates On Post Thaw Viability Of Dog Semen. *J Reprod Fertil.* 1993; 47:291-296.

Diaz, O., C. Arancibia. 1971. Calificación De La Fertilidad Potencial De Los Animales Domésticos. Santiago. Chile. Eds. Vera-Gianini.

Dumond C, Fontbonne A. Les Indispensables De L Animaux De Compagne. Ed P.M.C.A.C. Paris (Francia), 1993; P.153-159.

Farstad, W. 1984. Bitch Fertility After Natural Mating And After Artificial Insemination With Fresh Or Frozen Semen. *J. Small Anim. Pract.* 25: 561-565.

.Farstad W, Andersen-Berg K. Factors Influencing The Success Rate Of Artificial Insemination With Frozen Semen In The Dog. *J Reprod Fertil.* 1989; 39:289-292.

Farstad, W. 2000. Assisted Reproductive Technology In Canid Species. *Theriogenology* 53: 175-186. Duction. W. B. Saunders Co. Philadelphia, Usa.

Fastard W. Assisted Reproductive Technology In Canid Species. *Theriogenology.* 2000; 53:175-186.

Feldman Ec, Nelson Rw. Canine And Feline Endocrinology And Reproduction. *J Reprod Fertil.* 1993; 47:257-260.

England Gcw, Allen We. Seminal Characteristics And Fertility In Dogs. *Vet Rec* 1989; 125:399. England Gcw. Criopreservation Of Dog Semen: A Review. *J Reprod Fertil.* 1993; 47:243-255.

Ettinger Sj, Feldman Er. Textbook Of Veterinary Internal Medicine. Ed. Saunders Philadelphia (United States), 1995; P.1664-1662

Fosberg C L Accurate Monitory Of The Estrus Cycle Of The Bitch For Artificial Insemination. Proceedings 19 Th World Congress Of The Wasava. 1994; P.601-605.

Fosberg Cl, Fosberg M. Fertility In Dogs In Relation To Semen Quality And The Time And Site Of Insemination With Fresh And Frozen Semen. *J. Reprod. Fertil.* 1989; 39:299-310.

Fosberg Cl. Achieving Canine Pregnancy By Using Frozen Or Chilled Extended Semen. *Vet Clin North Am* 1991; 21:467-485.

Fosberg Cl. Artificial Insemination With Semen Fresh, Chilled Extended And Frozen-Thawed Semen In The Dog. Seminar In Veterinary Medicine And Surgery. 1996; 10 (1):48-58.

Fosberg Cl, Strom B, Govette G. Comparison Of Fertility Data From Vaginal Vs Intrauterine Insemination Of Frozen-Thawed Dog Semen: A Retrospective Study. *Theriogenology* 1999; 52:11-23.

Gill, H., C. Kaufman, R. Foote, W. Kirk. 1970. Artificial Insemination Of Beagle Bitches With Freshly Collected, Liquid-Store, And Frozen-Stored Semen. *Am. J. Vet. Res.* 31: 1807-1813.

Günzel-Apel Ar. Artificial Insemination With Frozen Semen In The Bitch: Intrauterine Insemination Techniques. Third Conference Of The European Society For Domestic Animal Reproduction. 1999; 6:71-72.

Harrop Ae. Mating Natural Service And Artificial Insemination In Reproduction In The Dog. Ed., Tindall & Cox. London (England), 1960; P.87-99.

Heape, W. 1897. Artificial Insemination Of Mammals And The Subsequent Fertilisation Or Impregnation Of Their Ova. *Proc Royal Soc. London*: 61: 52-56.  
Citado Por Farstad, W. 2000. Assisted Reproductive Technology In Canid Species. *Theriogenology* 53: 175-186.

Held Jp. Critical Evaluation Of The Success And Role Of Chilled And Frozen Semen In Today's Veterinary Practice. Proceedings Of Canine Reproduction Symposium. September 1997. American College Of Theriogenologist 1997; P.49-59.

Inaba, T., N.Matsui, R. Shimizu, T. Imori. 1984. Use Of Echography In Bitches For Detection Of Ovulation And Pregnancy *Vet. Rec.* 115: 276-277.

Johnston, S. 1995. Breeding Management Of The Bitch. En: Ettinger, S., E. Feldman (Eds.). *Textbook Of Veterinary Internal Medicine*. W.B. Saunders Co., Philadelphia, Pp. 160

Jhonston Dj, Kuztritz Mvr, Olson P. 2001 *Canine And Feline Theriogenology*. Ed. Saunders. Philadelphia (United States), 16:287-306. 4-606.

Johnston Sd. Performing A Complete Canine Semen Evaluation In A Small Animal Hospital. *Vet. Clin. North. Am.* 1991; 21 (3):545-551.

Kirk Rw. *Current Veterinary Therapy X: Small Animal Practice*. Ed. Saunders. Philadelphia (United States). 1989; P.1247-1259.

Kong Ik, Choi Sg, Bae Hi, Oh Dh, Oh Hj, Kim Hr, Kin Jk. Effect Of Addition Of Royal Jelly In Tris -Buffer Extender On The Pos -Thaw Viability Of Canine Semen. *Theriogenology* 2001; 55:309.

Lardy Ha, Philips Ph. Preservation Of Spermatozoa. *Proc Am Soc Anim Prod.* 32 Nd Ann Meet 1939; P.219- 231.

Lindsay Fe, Jeffcoate Ia, Concannon Pw. Vaginoscopy And Fertile Period In The Bitch. Proceedings 11 Th International Congress On Animal Reproduction And Artificial Insemination. Dublin. 1988; 4:565.

Linde-Forsberg, C., 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.* 39 (Suppl.): 299-323.

Linde-Forsberg, C., M.Forsberg. 1993. Results Of 527 Controlled Artificial Inseminations In Dogs. *J. Reprod. Fertil.* 47 (Suppl.): 313-323.

Linde-Forsberg, C. 1994. Artificial Insemination In The Dog. W.S.A.V.A. Xix World Congress, Durban, South Africa, Pp. 606-611.

Linde-Forsberg, C. 1995. Artificial Insemination With Fresh, Chilled Extended And Frozen-Thawed Semen In The Dog. En: Memon, M. (Ed.) Seminars In Veterinary Medicine And Surgery (Small Animals). W.B. Saunders Co., Philadelphia, Pp. 48-58.

Marshall F, Hugh A. Reproduction In The Male In Marshalls Physiology Of Reproduction. Ed Churchill Livingstone. New York (United States), 1990; P.769-775

Morrow Da. Current Therapy In Theriogenology: Diagnosis, Treatment And Prevention Of Reproductive Disease In Animals. Ed. Saunders. Philadelphia (United States). 1980; P.661-665.

Morton Db, Bruce Sg. Semen Evaluation, Criopreservation And Factors Relevant To The Use Of Frozen Semen In Dogs. J Reprod Fertil. 1989; 39:311-316.

Mc Donald, L. 1975. Veterinary Endocrinology And Reproduction. 2<sup>nd</sup> Ed. Lea & Febiger.

Nothling Jo, Volkman Dh. Semen Quality Alter Thawing: Correlation With Fertility And Fresh Semen Qual- Ity In Dogs. J Reprod Fertil. 1997; 51:109-116.

Nothling Jo, Volkman Dh. Effect Of Addition Of Autologous Prostatic Fluids On The Fertility Of Frozen-Thawed Dog Semen After Intravaginal Insemination. J Reprod Fertil. 1993; 47:325-327.

Nötling Jo, Gerstenberg C, Volkman Dh. Success With Intravaginal Insemination Of Frozen-Thawed Dog Semen. A Retrospective Study. As Afr Vet Ass. 1995; 66 (2):49-55.

Rota, A., B. Strom, C. Linde-Forseberg. 1995. Effects Of Seminal Plasma And Three Extenders On Canine Semen Stored At 4°C. *Theriogenology*. 44: 885-900.

Salamon S, Maxwell Wmc. Storage Of Ram Semen. Anim Reprod Sci. 2000; 62:77-111.

Sanchez, A., W. Von Frey, M. De Los Reyes. 1995. Efecto De Diluyentes Y Plasma Seminal En La Preservación De Espermatozoides Equinos Refrigerados. *Vet. Arg.* 113: 172-178.

Sánchez, A. 1998. Inseminación Artificial En Perros. Iv Curso Internacional De Medicina Y Cirugía En Pequeños Animales. Mevepa V Región - Universidad De Chile. Concón, Chile, Pp. 122-131.

Sánchez, A. 2000. Examen Clínico Reproductivo En La Perra Doméstica. Curso Tópicos En Reproducción De Pequeños Animales. Universidad De Chile. Santiago, Chile, Pp. 60-66.

Shille, V. 1989. Reproductive Physiology And Endocrinology Of The Female And Male. En: Ettinger, S. (Ed.). Textbook Of Veterinary Internal Medicine. W. B. Saunders Co., Philadelphia, Pp. 1777-1791.

Silva Ldm, Onclin K, Lejeune B, Vestergen Jp. Comparison Of Intravaginal And Intrauterine Insemination Of Bitches With Fresh Or Frozen Semen. *Vet Rec.* 1996; P.154-157.

Spallanzani L. Observazione E Esperienze In Torno Ai Vercimelli Spermatici Del Uomo E Degli Animali. Opuscoli Di Fisica Animale E Vegetatile Opuscolo. li. Modena. 1776.

- Seager Swj. Successful Pregnancies Utilizing Frozen Dog Semen. *Ai Digest* 1969; 17:6-7.
- Smith Fo. Update On Freezing Canine Semen, In Kira Rw (Ed) *Current Veterinary Therapy* Ix. Ed Saunders Philadelphia (United States), 1986; P.1243-1248.
- Stornelli Ma, Stornelli Mc, Arauz Ms, Savignone Ca, García M, De La Sota RI. Estudio Comparativo Del Efecto De Tres Diluyentes Sobre La Supervivencia De Se- Men Canino Almacenado A 4°C. *Revista Brasileira De Reproducción Animal*. 01; 25 (3):468-470.
- Szász F, Gábor G, Solti L. Comparative Study Of Different Methods For Dog Semen Cryopreservation And Testing Under Clinical Conditions. *Acta Veterinaria Hungarica* 2000; 48 (33):325-333.
- Tsutsui T, Shimizu O, O'hara N. Relationship Between The Number Of Sperms And The Rate Of Implantation In Bitches Inseminated Into Unilateral Uterine Horn. *J Vet Med Sci*. 1989; 51:257-263.
- Tsutsui T, Hase M, Hori T, Komoriya K, Shimizu N, Nagakubo K, Kawakami E. Effect Of Addition Of Orvus Es Paste To Frozen Canine Semen Extender On Sperm Acrosomes. *J Vet Med Sci* 2000; 62 (5):537-538.
- Tello, L., M. De Los Reyes, A. Bernal. 1988. Descripción De Algunas Características Seminales En Caninos De Raza Ovejero Alemán. *Avances En Cs. Vet.* 3: 52-56.
- Tsutsui, T., T. Tezuka, T. Shimizu, I. Murao, E. Kawakami, A. Ogasa. 1988. Artificial Insemination With Fresh Semen In Beagle Bitches. *Jpn. J. Vet. Sci.* 50 : 193-198.
- Tsutsui, T. 1989. Gamete Physiology And Timing Of Ovulation And Fertilization In Dogs. *J. Reprod. Fertil.* 39 (Supl.): 269-275.
- Varner, D., T. Blanchard, T. Love, C. Garcia, R. Kenney. 1988. Effect Of The Cooling Rate And Storage Temperature On Equine Spermatozoal Motility Parameters. *Theriogenology.* 29 : 1043-1054.
- Watson Pf. Recent Developments And Concepts In The Cryopreservation Of Spermatozoa And The Assessment Of Their Post-Thawing Function. *J Reprod Fertil* 1995; 7:781-791.
- Watson Pf. The Causes Of Reduced Fertility With Cryopreserved Semen. *Anim Reprod Sci.* 2000; 60:481-492
- Wilson M. Non Surgical Intrauterine Artificial Insemination In Bitches Using Frozen Semen. *J Reprod Fertil.* 1993; 47:307-311.
- Wildt De. Laparoscopy, In Burke T. J. *Small Animal Reproduction And Infertility*. Ed. Lea & Febiger. Philadelphia (United States), 1986; P.121-140.
- Wright, P. 1991. Practical Aspects Of The Estimation Of The Time Of Ovulation And Of Insemination In The Bitch. *Aust. Vet. J.* 68:10-13.

