

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO**

**UNIDAD LAGUNA**

**DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



**“Congelación de semen canino con Estensores  
Canipro ”**

**TESIS**

**POR**

**MARIA ELENA DAVILA GUTIERREZ**

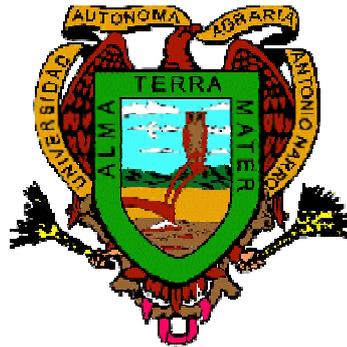
**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OBTENER EL TÍTULO DE:**

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**TORREÓN, COAHUILA**

**JUNIO DE 2009**

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



**“Congelación de semen canino con Estensores  
Canipro ”**

**TESIS**

POR

**MARIA ELENA DAVILA GUTIERREZ**

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OBTENER EL TÍTULO DE:

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

ASESOR

**M.V.Z. CARLOS RAÚL RASCÓN DÍAZ**

COLABORADOR:

**M.C. SERGIO IGNACIO BARRAZA**

**TORREÓN, COAHUILA**

**JUNIO DE 2009**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO**

**UNIDAD LAGUNA**

**DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**

**TESIS**

**“Congelación de semen canino con Estensores  
Canipro ”**

**APROBADO POR EL COMITÉ DE TESIS**

**PRESIDENTE DEL JURADO**



Handwritten signature of Carlos Raúl Rascón Díaz, with the name 'Rascón' and '102' visible in the script.

---

**MVZ. CARLOS RAÚL RASCÓN DÍAZ**

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



Handwritten signature of José Luis Fco. Sandoval Elías, with the name 'Sandoval' visible in the script.

---

**M.C. JOSÉ LUIS FCO. SANDOVAL ELÍAS**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO**

**UNIDAD LAGUNA**

**DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**

**“Congelación de semen canino con Estensores  
Canipro”**



---

**MVZ CARLOS RAÚL RASCÓN DÍAZ  
PRESIDENTE**



---

**MC. SERGIO IGNACIO BARRAZA  
VOCAL**



---

**M.C. JORGE ITURBIDE RAMÍREZ  
VOCAL**



---

**M.C. ESEQUIEL CASTILLO ROMERO  
VOCAL SUPLENTE**

<b>INDICE GENERAL</b>	<b>PAG.</b>
<b>DEDICATORIA</b>	
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	
<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCION.....</b>	<b>2</b>
<b>ANTECEDENTES.....</b>	<b>6</b>
<b>I. ANATOMÍA DEL APARATO REPRODUCTOR DEL PERRO.....</b>	<b>8</b>
<b>1.1. Macho.....</b>	<b>8</b>
1.1.1. Órganos genitales del macho.....	8
1.1.1.1. Escroto.....	8
1.1.1.2. Testículos .....	8
1.1.1.3. Epidídimo.....	8
1.1.1.4. Conductos deferentes.....	9
1.1.1.5. Cordón espermático (funículos spermaticus).....	9
1.1.1.6. Canal inguinal.....	9
1.1.2. Glándulas genitales accesorias.....	10
1.1.2.1. Glándulas vesiculares.....	10
1.1.2.2. Próstata.....	10
1.1.2.3. Glándulas bulbouretrales.....	10
1.1.3. Genitales externos.....	10
1.1.3.1. Pene.....	10
1.1.3.2. Prepucio.....	11

1.1.3.3. Uretra masculina.....	11
<b>II. ENDOCRINOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN.....</b>	<b>11</b>
<b>2.1. Hormonas Hipotalámicas.....</b>	<b>11</b>
2.1.1. Hormona liberadora de gonadotropina (GnRH).....	11
<b>2.2. Hormonas Hipofisarias.....</b>	<b>12</b>
2.2.1. Hormona Folículo Estimulante (FSH).....	12
2.2.2. Hormona Luteinizante (LH).....	13
2.2.3. Prolactina.....	13
<b>2.3. Hormonas foliculares.....</b>	<b>13</b>
2.3.1. Estrógenos.....	13
2.3.2. Progesterona.....	14
2.3.3. Prostaglandinas.....	14
2.3.4. Andrógenos.....	15
2.3.5. Inhibina.....	15
<b>III. FISIOLÓGÍA DE LA REPRODUCCIÓN.....</b>	<b>15</b>
<b>3.1. Fisiología de la Reproducción del Macho.....</b>	<b>15</b>
3.1.1. Espermatogénesis.....	15
3.1.2. Control de la temperatura.....	17
3.1.3. Transporte del semen.....	17
3.1.4. Erección.....	18
3.1.5. Eyaculación.....	19
<b>IV. HISTORIA DE LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL.....</b>	<b>20</b>

<b>4.1. Origen de la Inseminación Artificial (IA).....</b>	<b>20</b>
<b>4.2. Historia de la Inseminación Artificial en Caninos.....</b>	<b>21</b>
<b>V. INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN CANINOS.....</b>	<b>23</b>
<b>5.1. Objetivos de la Inseminación Artificial en Caninos.....</b>	<b>23</b>
<b>5.2. Causas de Uso de la Inseminación Artificial en Caninos.....</b>	<b>24</b>
5.2.1. Causas de uso de la Inseminación Artificial en hembras.....	24
5.2.2. Causas de uso de la Inseminación Artificial en machos.....	25
<b>5.3. Ventajas y Desventajas de la Inseminación Artificial en Caninos.....</b>	<b>25</b>
<b>5.4. Limitaciones de la Inseminación Artificial en Caninos.....</b>	<b>27</b>
<b>VI. EVALUACIÓN DE LOS REPRODUCTORES.....</b>	<b>27</b>
<b>6.1. Evaluación del macho reproductor.....</b>	<b>27</b>
<b>6.2. Evaluación de la hembra reproductora.....</b>	<b>28</b>
6.2.1. Cultivo vaginal.....	28
6.2.2. Brucella canis.....	29
<b>VII. COLECCIÓN DE SEMEN PARA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN CANINOS.....</b>	<b>29</b>
<b>7.1. Equipo Necesario para Realizar la Colección de Semen Canino</b>	<b>31</b>
<b>7.2. Manejo del Semen Canino para la Inseminación Artificial.....</b>	<b>32</b>
<b>7.3. Evaluación del Semen Canino.....</b>	<b>33</b>
7.3.1. Evaluación Macroscópica del semen canino.....	35

7.3.1.1. Volumen.....	35
7.3.1.2. Color.....	35
7.3.1.3. Olor.....	36
7.3.1.4. pH.....	36
7.3.2. Evaluación Microscópica del semen canino.....	36
7.3.2.1. Evaluación de la motilidad espermática.....	36
7.3.2.2. Concentración espermática.....	37
7.3.2.3. Cuenta espermática total.....	38
7.3.2.4. Relación de espermatozoides vivos y muertos.....	38
7.3.2.5. Análisis morfológico de las células espermáticas.....	38
7.3.2.6. Otras células.....	41
7.3.3. Cultivo del semen.....	41
7.3.4. Evaluación del "Hamilton Thorn" basada en un sistema automatizado computarizado. ....	42
<b>7.4. Métodos de preservación del semen.....</b>	<b>42</b>
7.4.1. Semen fresco.....	43
7.4.2. Semen refrigerado .....	44
7.4.2.1. Técnica para la refrigeración del semen .....	44
7.4.3. Semen congelado.....	46
7.4.3.1. Técnica de congelación de semen.....	47
7.4.3.2. Técnica para descongelar semen canino.....	47
7.4.3.3. Supervivencia del espermatozoide después de descongelar.....	48
<b>VIII. JUSTIFICACION.....</b>	<b>51</b>

<b>IX. OBJETIVOS.....</b>	<b>52</b>
<b>X. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>52</b>
<b>XI. RESULTADOS.....</b>	<b>55</b>
<b>XII. DISCUSION.....</b>	<b>58</b>
<b>XIII. CONCLUSION.....</b>	<b>60</b>
<b>XIV. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>61</b>

## **DEDICATORIA**

### **A DIOS**

Por darme la fuerza necesarias para salir adelante en cada tropiezo de mi vida. Por ponerme pruebas a veces tan difíciles pero que sabía que iba a superar y aprender de cada una. Por darme a mis padres, mis abuelos y en general a toda mi familia. Pero sobre todo salud para hacer y superar todo lo que se me pusiera en frente como lo fue este reto de terminar mi carrera y ser lo que siempre soñé y no solo se quedara en una ilusión de niñez.

### **A MIS PADRE**

#### **MAMI**

No hay palabras que describan lo importante que eres en mi vida y lo agradecida que estoy por brindarme tu apoyo, tu amistad y sobre todo tu amor incondicional. GRACIAS por cada regaño, por cada palabra, consejo y ejemplo de salir siempre adelante pese a los que fuera. Sabes que eres la persona mas importante en mi vida y que eres mi freno o mi fuerza para cada cosa que hacia y que hare. Te estaré eternamente agradecida y seguiré tu ejemplo como madre por que me enseñaste que no hay amor mas grande que el de madre.

Sabes que todo este esfuerzo fue pensando en ti para que te sientas orgullosa de mi y espero no fallarte nunca.

TE QUIERO MUCHISIMO ..... GRACIAS

#### **PAPI**

Sabes que te quiero mucho que te estoy eternamente agradecida por todo tu apoyo, por tus regaños y consejos. Sabes que este logro también te lo debo a ti y espero y te sientas orgulloso de mi. GRACIAS por todo tu amor muy a tu manera pero créeme que nunca he dudado de el. Espero algún día poderte entender y perdóname si alguna vez te juzgue TE QUIERO MUCHISIMO

#### **MAGUE**

Gracias hermana por tu apoyo y tu amistad sabes que te quiero mucho y siempre4 cuenta conmigo.... A y gracias por ser mi cómplice en muchas cosas.

#### **A MIS ABUELITOS**

Abuelito Nico y Elenita Por todo el amor incondicional que me han dado siempre, por ser como unos padres para mi. De verdad que no he conocido en mi vida personas tan buenas como lo son ustedes. De verdad Gracias por tantas cosas que me han enseñado con su ejemplo sobre todo el amor hacia los demás.

Abuelita Mike muchas gracias por todas las cosas que ha hecho por mi, por

su amor y su apoyo incondicional sabe que la quiero mucho y que esta meta alcanzada también es gracias a usted.

Que Dios los bendiga y me los cuide muchísimo tiempo mas para que sigan compartiendo mis logros.

#### A MIS TIOS Y PRIMOS

Tete, Niko, Vero y mis primos Luis y Ronaldo. Gracias por su apoyo y por su cariño de familia Gracias los quiero mucho...

#### A VLADIMIR RODRIGUEZ

GRACIAS mi amor por todo tu apoyo por estar conmigo en las buenas y en las malas, por ayudarme a terminar mi carrera y por brindarme también tu amistad.

TE AMO y te doy las gracias por estar a mi lado, de verdad jamás pensé en encontrar una persona tan compatible conmigo, sobre todo por el amor que le tenemos a los animales.

#### A MIS AMIGOS

Ceci, Lili, Paty, a mi hermanito Fernando (chilango), Víctor, Adrian por su gran amistad de verdad no saben cuanto los voy a extrañar, nunca voy a olvidar el apoyo que me brindaron los quiero mucho.

A todos mis compañeros de salón gracias por todas las cosas que me enseñaron y desde que llegue a esta escuela me brindaron su apoyo y me abrieron los ojos hacia otras culturas.

#### A MIS PROFESORES

Mil Gracias de verdad que estoy muy agradecida por todo lo que me enseñaron, por los consejos que me dieron, por prepararme para mi futuro. Por inculcarme el amor a mi ALMA TERRA MATER.

#### A LOS INSPIRADORES DE MI MAS GRANDE ESFUERZO

DANDDY (q.e.p.d.), CHOPPER Y PEEWEE mis perros, mis hijos por que han sido mi mas grande inspiración para escoger la carrera mas hermosa que hay, por ellos y por todos los animales que he ayudado y todos los que me faltan por eso es que me he esforzado por terminar mi carrera.

## **AGRADECIMIENTOS**

### **DIOS**

Por todas las bendiciones que me dio como los mis padres, mi familia, mis amigos y toda la gente que me quiere y esta a mi lado.

### **A MI ALMA TERRA MATER**

Que sin duda alguna es la mejor universidad que pude haber escogido, gracias de verdad por inculcarme aun mas el amor por los animales, por enseñarme en valor de la tierra, de la vida y de todo lo que nos rodea.

Por tantas culturas encontradas en cada unas de las personas que forman esta universidad como lo fueron todas las personas que hay conocí.

### **AL M.V.Z. CARLOS RAUL RASCON DIAZ**

Por todo su apoyo desde mi inicio de la carrera, por todos los consejos brindados, el apoyo y la enseñanza que me deja. Por ayudarme en los momentos difíciles de mi carrera, y darme ese impulso que me faltaba para enfrentarme a las cosas que para mi eran desconocidas.

Y por ultimo la ayuda que me brindo para terminar este trabajo de verdad le estoy muy agradecida y tan bien va dedicado a usted.. Muchas gracias

### **A MIS PROFESORES**

**M.C. MARIA HORTENCIA CEPEDA ELIZALDE, M.V.Z. HUGO RENE FLORES DEL VALLE Y AL M.V.Z. EDMUNDO GUZMAN**

Por todas las enseñanzas que me dejan, por ser unos de los pocos profesores que con su método de enseñanza me hicieron las clases interesantes, gracias por sus consejos, por su atención fuera de clases y sobre todo por que en cada clase me dejaron una enseñanza de vida. GRACIAS

## **RESUMEN**

El presente trabajo experimental pretendía valorar la calidad *in vitro* del semen canino congelado con estensores caniPRO A & B durante un periodo de 3 meses, así como evaluar la variación individual en la calidad seminal de 3 perros de las razas Bóxer, Pastor Alemán y Labrador. Cuatro eyaculados de cada perro se procesaron de acuerdo al protocolo de CaniPRO A & B de acuerdo al laboratorio Posteriormente, se procedió a la congelación para evaluar la calidad seminal (motilidad, porcentaje de espermatozoides vivos, porcentaje de células con morfoanomalías) a 1 día de post-congelamiento y a los 30 días después de la congelación; el semen fue congelado y almacenado en nitrógeno líquido. Tras la congelación, se observó que la motilidad, la vitalidad espermática y el porcentaje de células con morfoanomalías. Por otro lado, las características microscópicas en el semen fresco fueron prácticamente similares entre machos; sin embargo, tras el procesado y la posterior congelación del semen, se observaron diferencias entre individuos en la calidad seminal, especialmente en la motilidad espermática. Los resultados *in vitro* obtenidos en el estudio confirmaron que el uso de la congelación del semen es una alternativa potencial para conservar semen canino durante largos periodos de tiempo.

**Palabras Clave: Semen Congelado, Reproducción, Estensores, nitrógeno líquido, CaniPro A y B, Caninos, Motilidad, concentración, Morfoanomalias.**

## INTRODUCCIÓN

La investigación en el área de la reproducción canina se ha incrementado en los últimos años, la necesidad de obtener cada vez mejores ejemplares tanto en el ámbito médico como zootécnico representa un reto donde médicos veterinarios, criadores, asociaciones canófilas en conjunto deben trabajar para superarlo.( García, V. A). En los últimos 20 años, las técnicas de inseminación artificial y criopreservación seminal en la especie canina han experimentado un enorme desarrollo. El porcentaje de gestaciones obtenido en perras inseminadas con semen en fresco es muy elevado, tanto si se realiza una inseminación intravaginal profunda (Farstad y Andersen Berg, 1989; Forsberg, 1989) como si se utiliza una técnica de inseminación intrauterina (Silva y Verstegen, 1995; Silva y col., 1996). Cuando se utiliza semen congelado, el porcentaje de gestaciones obtenido es menor, particularmente si se realiza una técnica de inseminación intravaginal (Linde-Forsberg y Forsberg, 1989; Fontbonne y Badinand, 1993; Nöthling col., 1997). De manera general, se asume que el semen canino congelado puede ver reducida su capacidad fértil (Rijsselaere y col., 2002). La prueba definitiva para evaluar la fertilidad del semen canino congelado mediante cualquier protocolo de criopreservación es comparar el porcentaje de gestaciones que se obtiene tras la inseminación artificial (Rota y col., 1995). Sin embargo, es difícil llevar a cabo una comprobación experimental, ya que es necesario el uso de un gran número de animales para obtener conclusiones definitivas. En muchos estudios realizados *in vitro*, la calidad seminal del semen congelado-descongelado se valora mediante la determinación de diferentes parámetros seminales como la motilidad, la integridad de la membrana plasmática, las acrosomías y las morfoanomalías (Thomas y col., 1993; Ivanova y col., 1997; Peña y Linde-Forsberg, 2000a, b; Peña y col., 2003; Álamo y col., 2005). Diferentes autores han intentado establecer una correlación entre la fertilidad obtenida con una muestra de semen y la valoración seminal *in vitro* de los diferentes parámetros mencionados anteriormente (Rota y col., 1995). La motilidad post-congelación parece ser el mejor indicador de la fertilidad seminal (Nöthling y col., 1997).

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

La congelación en nitrógeno líquido es la técnica más utilizada para congelar y conservar semen canino durante largos periodos de tiempo (Olar y col., 1989; Hay y col., 1997; Peña y Linde-Forsberg, 2000a). En la especie canina, se han desarrollado diferentes protocolos de criopreservación seminal con nitrógeno líquido, utilizando diferentes tipos de diluyentes (Dobrinski y col., 1992; Fontbonne y Badinand, 1993; Nöthling y col., 1997; Ström y col., 1999) El porcentaje de fertilidad tras realizar una inseminación con semen congelado mediante nitrógeno líquido varía entre un 50-60% (Silva y Verstegen, 1995; Silva y col., 1996). Por otro lado, los perros muestran una gran variabilidad en la calidad seminal postcongelación, indicando que no es un método de congelación óptimo (Peña y col., 2003). Por tanto, parece necesario desarrollar nuevas técnicas de criopreservación seminal para obtener mayores porcentajes de fertilidad tras la realización de una inseminación artificial con semen congelado. Un estudio reciente (Álamo y col., 2005) desarrollado en perros mestizos, propone el uso de ultracongeladores de  $-152^{\circ}$  C como una técnica alternativa para la congelación y conservación de semen en la especie canina.

Los resultados de este estudio preliminar mostraron que la calidad seminal *in vitro*, cuatro meses post-congelación, era similar que la obtenida con nitrógeno líquido, indicando que el uso de ultracongeladores de  $-152^{\circ}$  C puede ser una técnica alternativa para la criopreservación seminal en la especie canina. Sin embargo, el bajo número de animales utilizados en este trabajo, hace necesario completar esta investigación utilizando un mayor número de animales y conservando las muestras durante periodos de tiempo más largos.

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

La Inseminación Artificial (IA) ha beneficiado el mejoramiento genético en los perros de raza pura. El desarrollo de IA (la primera generación de biotecnologías reproductivas), junto con la criopreservación de semen ha hecho posible la distribución por el mundo de material genético a un bajo costo. Diversas metodologías de criopreservación de semen, se están aplicando cada vez con más frecuencia con el fin de establecer bancos de reserva genética para conservar las diferentes especies en el futuro (Luvoni GC.). Las especies en vías de extinción son los principales impulsores y receptores de esta corriente (Fastard W.).

La primera comunicación de IA en caninos fue realizada en 1887 por Lazzaro Spallanzani quien utilizó semen fresco (Brown, R. M. 1992, Burgess, C. M., J. C. Bredl, J. M. Plummer y G. C. England. 2001, Corona, C. G. 2001). Sin embargo fue muchos años más tarde cuando este tópico se convirtió en foco de interés para la investigación. En 1956, Harrop (Cunningham, J. G. 1999) comunica que una de seis perras inseminadas con semen refrigerado después de seis días de almacenamiento resultó preñada. En 1954, Rowson (Davol, P. A. 2001) notifica la primera congelación de semen exitosa en caninos y más tarde en 1969, Seager (Davol, P. A. 2000.) obtiene la primera preñez con semen congelado en perros. Desde la ocurrencia de estos eventos, el interés de los criadores caninos en la IA y la criopreservación de semen han aumentado en forma creciente.

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

En la clínica reproductiva diaria las variables asociadas al manejo del semen en la descongelación, a la técnica de IA implementada y a la detección del momento de mayor fertilidad están fuertemente influenciadas por el entrenamiento del operador actuante, a la infraestructura de la clínica en la que se realiza el procedimiento y al estado de salud y nutrición de los reproductores utilizados (Esquivel, L. C. 2002, Farstad, W. 2000, Fayrer, H. F. 1996,

Fontbonne, A. y F. Badinand. 1993, Foster, R. y M. Smith. 2001). Estos hechos se relacionan tanto con las particularidades de la fisiología reproductiva de la hembra como con la especial sensibilidad del semen canino a los procesos de criopreservación y la falta de desarrollo en esta área. (Fontbonne, A. y F. Badinand. 1993, Gunzel, A. R. 1986.). Es así que son necesarias investigaciones dirigidas a mejorar la habilidad para mantener la capacidad fecundante del semen congelado en caninos y obtener así tasas de preñez y tamaños de camada satisfactorios. Para que sea posible la interacción óvulo-espermatozoide y el comienzo de una nueva vida, un número suficiente de espermatozoides fértiles debe arribar a la ampolla para encontrarse con los oocitos y que ocurra así la secuencia de eventos necesarios para la fertilización (Hutchison, R. V. 2001, <<http://www.amchessieclub.org/conception.html>).

## ANTECEDENTES

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

Los procesos de congelación-descongelación resultan en reducción de la fertilidad del semen criopreservado si lo comparamos con el semen fresco. Este hecho es el resultado tanto de la pérdida de viabilidad espermática (población de espermatozoides muertos) como de las alteraciones funcionales instauradas en la población sobreviviente (Pérez, O. A. 2001).

La prueba definitiva para evaluar la fertilidad del semen canino congelado mediante cualquier protocolo de criopreservación es comparar el porcentaje de gestaciones que se obtiene tras la inseminación artificial (Rota y col., 1995). Sin embargo, es difícil llevar a cabo una comprobación experimental, ya que es necesario el uso de un gran número de animales para obtener conclusiones definitivas. En muchos estudios realizados *in vitro*, la calidad seminal del semen congelado-descongelado se valora mediante la determinación de diferentes parámetros seminales como la motilidad, la integridad de la membrana plasmática, las acrosomías y las morfoanomalías (Thomas y col., 1993; Ivanova y col., 1997; Peña y Linde-Forsberg, 2000a, b; Peña y col., 2003; Alamo y col., 2005). Diferentes autores han intentado establecer una correlación entre la fertilidad obtenida con una muestra de semen y la valoración seminal *in vitro* de los diferentes parámetros mencionados anteriormente (Rota y col., 1995). La motilidad post-congelación parece ser el mejor indicador de la fertilidad seminal (Nöthling y col., 1997). Por otro lado, en la mayoría de estudios desarrollados en la especie canina, antes del procesado del semen, se realiza un prueba seminal de los eyaculados de machos diferentes (Hay y col, 1997; Peña y Linde-Forsberg, 2000a; Peña y col, 2003), por lo que resulta imposible establecer si existe variación individual.

La congelación en nitrógeno líquido es la técnica más utilizada para congelar y conservar semen canino durante largos periodos de tiempo (Olar y col., 1989; Hay y col., 1997; Peña y Linde-Forsberg, 2000a). En la especie canina, se han desarrollado diferentes protocolos de criopreservación seminal con nitrógeno líquido, utilizando diferentes tipos de diluyentes (Dobrinski y col., 1992; Fontbonne y Badinand, 1993; Nöthling y col., 1997; Ström y col., 1999) El porcentaje de fertilidad tras realizar una inseminación con semen congelado mediante nitrógeno líquido varía entre un 50-60% (Silva y Verstegen, 1995; Silva y col., 1996). Por otro lado, los perros muestran una gran variabilidad en la calidad seminal postcongelación, indicando que no es un método de congelación óptimo (Peña y col., 2003). Por tanto, parece necesario desarrollar nuevas técnicas de criopreservación seminal para obtener mayores porcentajes de fertilidad tras la realización de una inseminación artificial con semen congelado. Un estudio reciente (Álamo y col., 2005) desarrollado en perros mestizos, propone el uso de ultracongeladores de  $-152^{\circ}$  C como una técnica alternativa para la congelación y conservación de semen en la especie canina. Los resultados de este estudio preliminar mostraron que la calidad seminal in vitro, cuatro meses post-congelación, era similar que la obtenida con nitrógeno líquido, indicando que el uso de ultracongeladores de  $-152^{\circ}$  C puede ser una técnica alternativa para la criopreservación seminal en la especie canina. Sin embargo, el bajo número de animales utilizados en este trabajo, hace necesario completar esta investigación utilizando un mayor número de animales y conservando las muestras durante periodos de tiempo más largos.

# **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 esta dirigido dorsal y caudalmente (Allen, 1992; Sisson *et al.*, 1993). Atraviesan el canal inguinal entre los 4 y 5 días de edad (Cunningham, 1999), y alcanzan su ubicación en el escroto en 35 días (Allen, 1992).

#### **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).

## **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 (Davol, 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 esteroideas producidas en la perra por folículos en crecimiento. Los principales son  $17\alpha$ -estradiol,  $17\beta$ -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. Andr6genos**

Son producidos por c6lulas en los test6culos que forman peque1os islotes entre los t6bulos semin6feros; estas son las c6lulas intersticiales o c6lulas de Leydig (Allen, 1992).

La conversi3n de testosterona a dihidrotestosterona inducir4 el desarrollo de la gl4ndula pr3stata, la uretra masculina, el pene, y el escroto (Allen, 1992; Davol, 2001). Despu3s, los test6culos descienden al escroto y completan el desarrollo del sistema reproductor masculino (Daval, 2001). Los efectos adicionales de la testosterona incluir4n la inducci3n de otras caracter6sticas f6sicas del g6nero as6 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 var6an 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 6stas hormonas en la perra, pero se sabe que sus concentraciones circulantes alcanzan un m4ximo al mismo tiempo que la oleada de LH (Allen, 1992).

#### **2.3.5. Inhibina**

Esta es una hormona producida en los test6culos por las c6lulas de Sertoli que inhibe la liberaci3n de FSH (Allen, 1992; Davol, 2000; Ruckebusch *et al.*, 1991). No se ha demostrado su existencia en el perro (Allen, 1992)

### **III. FISIOLOG6A DE LA REPRODUCCI3N**

#### **3.1. Fisiolog6a de la Reproducci3n del Macho**

El test6culo es el 3rgano 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. Espermatog6nesis**

Constituye un proceso complejo mediante el cual se producen los espermatozoides (c6lulas germinativas masculinas) en los tubos semin6feros 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 centríolos intervienen en el desarrollo de la cola. La mayor parte del citoplasma queda en las *células de Sertoli* que aparecen sobre la membrana basal de los tubos seminíferos que regulan la metamorfosis de espermátida a espermatozoide (Allen, 1992; Cunningham, 1999).

La espermatogénesis comienza a los 4 meses de edad aunque los espermatozoides no aparecen en el eyaculado hasta los 10-12 meses (Allen, 1992). En el macho reproductor, la producción de semen es directamente proporcional al tamaño testicular. El semen se guarda en los compartimientos extragonadales del epidídimo y el conducto deferente (Cunningham, 1999; Davol, 2001). La cantidad de semen reservada dependerá de la frecuencia e intervalos entre eyaculaciones. Subsecuentemente la eyaculación frecuente puede causar una reducción en el rendimiento del semen, ya que las reservas de semen se vacían según informes recibidos practicando una eyaculación por día, durante 5 a 7 días. Por consiguiente, una vez que se vacían reservas, el número de espermatozoides total sólo será representado por la producción diaria de semen por los testículos. Por ésta razón la recolección de semen se realiza cada dos días, para permitir que vuelva a tener reservas de espermatozoides (Davol, 2001).

Existen pocas pruebas a favor de que el eyaculado de un perro que realiza cubriciones de forma infrecuente contendrá un número elevado de espermatozoides anormales (Allen, 1992). Por el contrario, los machos con alta demanda pueden experimentar fertilidad menos óptima en ciertos momentos a

lo largo de sus años reproductores. La calidad del semen, por consiguiente, es afectada a menudo por factores como la edad, el grado de excitación, frecuencia de eyaculación, técnica de la colección y manejo de la muestra (Davol, 2001).

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

### **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 (Davol, 2001).

#### **3.1.4. Erección**

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

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

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

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

## **IV. HISTORIA DE LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL**

### **4.1. 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).

## **4.2. 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 canidos (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).

## **V. INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN CANINOS**

### **5.1. 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).

## **5.2. 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).

### **5.2.1. 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).

### **5.2.2. 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).

### **5.3. 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 crucea 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).

#### **5.4. 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).

## **VI. 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)

### **6.1. 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 crucea 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).

## **6.2. 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 vaginoscopia para determinar que no existe ningún obstáculo que impida la cópula ó dificulte el parto (Esquivel, 2002).

### **6.2.1. 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 la 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).

### **6.2.2. 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)

## **VII. 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).

## **7.1. 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).

## **7.2. 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).

### **7.3. 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).

### **7.3.1. 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).

#### **7.3.1.1. 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).

#### **7.3.1.2. 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).

### **7.3.1.3. 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).

### **7.3.1.4. 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).

## **7.3.2. 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.

### **7.3.2.1. 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).

### **7.3.2.2. Concentración espermática**

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

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

### **7.3.2.3. Cuenta espermática total**

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

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

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

### **7.3.2.4. 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).

### **7.3.2.5. Análisis morfológico de las células espermáticas**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

a) *Anormalidades primarias:*

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

b) *Anormalidades secundarias:*

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

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

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

#### **7.3.2.6. 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).

#### **7.3.3. 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).

#### **7.3.4. 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 Verstegen, 2001a).

#### **7.4. 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 ultra estructura 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.

#### **7.4.1. 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).

## **7.4.2. 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).

### **7.4.2.1. 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).

#### **7.4.3. 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)

#### **7.4.3.1. 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  $100 \times 10^6$  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.

#### **7.4.3.2. 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).

#### **7.4.3.3. 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 fue 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 ( $50 \times 10^6$ ,  $100 \times 10^6$ ,  $200 \times 10^6$  y  $400 \times 10^6$  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  $200 \times 10^6$  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  $9 \times 10^9$  espermatozoides/ml., y se agregó Ext-1 para obtener  $200 \times 10^6$  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).

## VIII. JUSTIFICACIÓN

La utilización de diluyentes caniPRO A & B que permitan conservar el semen canino congelado, hará posible el traslado de semen a diferentes puntos de nuestro país. Esto evitará el traslado de animales para la realización de la monta natural (servicio natural), disminuyendo los costos, el estrés y esfuerzo que esto implica. Así mismo realizar varias cubriciones a la vez en lugares diferentes. Es importante destacar que el proceso de congelación de semen canino es de mediano a un alto costo, pudiendo implementarse con equipamiento y moderado entrenamiento del operador. Por otro lado, el semen congelado puede utilizarse realizando IA intravaginal, intrauterina o transcervical. La implementación de técnicas de congelación de semen e inseminación artificial con semen congelado 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 criopreservación 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 un mayor tamaño de camada.

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 reproductiva diaria (Stornelli *et al.*, 2001).

## **IX. OBJETIVOS**

- Preservar semen canino congelado en nitrógeno líquido con Extensores caniPRO A & B. (minitube).
- Evaluar el semen canino a 1y 30 días después de la congelación.

## **X. MATERIAL Y MÉTODOS**

### Animales

Los animales utilizados pertenecían a diferentes propietarios, que nos cedían periódicamente sus perros para la obtención del semen. Se utilizaron 3 ejemplares; de la raza Bóxer, Pastor Alemán y Labrador; con edades entre 2-4 años y un peso medio de 28 kg. Un mes antes de comenzar el estudio, los perros fueron entrenados para la obtención de semen mediante estimulación manual.

### Recogida y evaluación seminal.

El semen se recogía mediante estimulación manual sobre el bulbo penenano, depositando el eyaculado en un tubo de plástico graduado y atemperado (Peña y Linde-Forsberg, 2000a; Yildiz y col., 2000). Se obtenía un eyaculado semanal de cada perro, durante un total de cuatro semanas consecutivas. Por tanto, en esta experiencia se utilizaron cuatro eyaculados de cada uno de los tres machos. Inmediatamente tras la recogida, la fracción espermática era analizada para determinar su volumen, concentración y motilidad, así como el porcentaje de vitalidad y de morfoanomalías. El volumen seminal se determinaba directamente en el tubo de recogida (Rota y col., 1999). Para calcular la concentración, una parte proporcional de semen se diluyó (1:40) en solución salina formolada y tras colocar una gota en un hemocitómetro, se determinaba la concentración con un microscopio óptico (Mickelsen y col., 1993; Rijsselaere y col., 2002). El porcentaje de motilidad se calculaba por valoración de una muestra de semen, usando un microscopio de contraste de fases, provisto de una placa calentadora (37°C), a 100 y 200 aumentos (Nöthling y col., 1997; Peña y col., 2003; Alamo y col., 2005).

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

#### Procesado del semen

Los eyaculados de cada animal fueron procesados de forma individual. Se calentó las dos botellas de medio de cultivo para CaniPRO parte A y parte B a la temperatura ambiente, se añadió 20% de yema de huevo al volumen de CaniPRO congelación de la parte A y parte B ( 4 ml de yema de huevo de una botella de 20 ml de medios de comunicación; añadir 2 ml de yema de huevo de una botella de 10 ml medios de comunicación). Se mezcla suavemente.

Se mantiene la parte A botella a temperatura ambiente y se utilizara en el paso 1. Después se utiliza la parte B botella a 4 °C para ser utilizado en el paso 2.

Se utiliza solo la fracción rica en espermatozoides de la eyaculación (2ª fracción) para la congelación, por que en las otras dos fracciones la calidad del espermatozoides disminuye.

Se centrifugo a 700 revoluciones por 10-15 minutos. Después de la centrifugada se descarta el sobrenadante y se vuelve a suspender el espermatozoides original utilizando CaniPRO parte A

#### Proceso de Congelación

Paso 1: poco a poco se añadió la parte A de la congelación, con 1 parte de espermatozoides por 1 parte de parte A ( 2 ml de espermatozoides y luego se añadió 2 ml de CaniPRO parte A.

Paso 2: Después del enfriamiento a 4°C se hace durante un mínimo de 2 horas, poco a poco (entre 1 a 3 min) se añade la parte B, que se pre-enfrió a 4°C. La adición de la parte B contiene glicerol que es absolutamente necesario para el proceso de congelación.

El volumen de la parte B que se añade debe ser la misma cantidad que la del volumen de semen recogido

Las pajuelas de relleno se pre- enfrió a 4°C se sella y mantiene a 4°C durante 20 a 60 minutos

Se coloca la pajuelas en un bastidor por encima del nitrógeno líquido ( 4-5 cm. por encima del NL.) durante 20 minutos. Se hunden las pajuelas en NL.

#### Descongelación del semen

Las descongelaciones se llevaron a cabo los días 1 y 30 tras la congelación. Se descongeló la pajuelas a 38°C durante 1 minuto.

El porcentaje de vitalidad y morfoanomalías se determinaba utilizando una extensión de eosina-nigrosina en un microscopio de contraste de fases a 1000 aumentos. El número de pajuelas valoradas cada día fue de 4 muestras/perro.

## XI. RESULTADOS

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

Tabla 1. Media de: Volumen, concentración, porcentaje de motilidad, viabilidad, y morfoanomalías; en los eyaculados de los ejemplares utilizados.

Perros	Eyaculados por perro	Volumen (ml)/ eyaculado	Concentración ( $\times 10^6$ células /ml)	Motilidad (%)	Viabilidad (%)	Morfoanomalías (%)
Pastor Alemán	4	3	250	78	88	4
Bòxer	4	2.5	185	85	70	5
Labrador	4	3	200	95	75	5
Media	4	2.83	211.6	90.20	77.6	4.66

El porcentaje de motilidad (media) obtenido a lo largo del periodo experimental se expresa en la Tabla 2 y Figura 1. Con la utilización de nitrógeno líquido (NL), la motilidad se situaba alrededor del 80 % (rango: 59.5-76.1%), no existiendo diferencias significativas dentro de cada macho a lo largo de todo el periodo experimental.

Tabla 2; Motilidad Espermática (%) a lo largo del experimento  
 \* Días después de la congelación.

Perros	*1	*30
Pastor Alemán	78	75
Bòxer	85	80
Labrador	95	85
Media	86	80

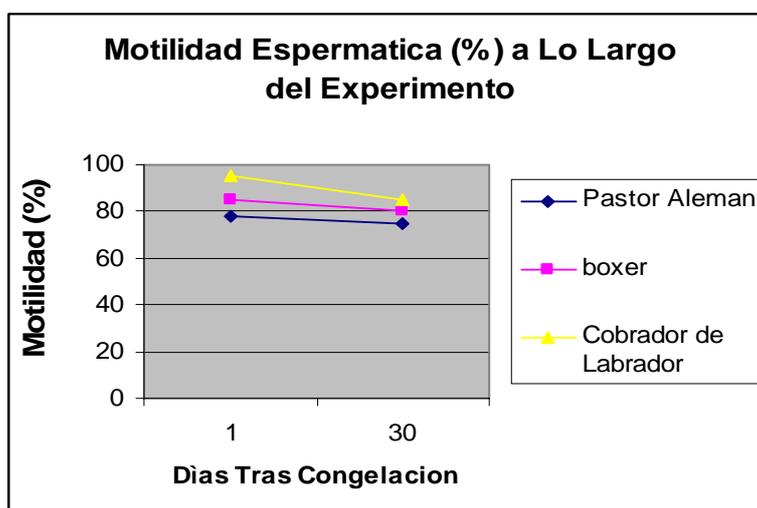


Fig. 1 Motilidad Espermática (%) a lo largo del experimento

El porcentaje de vitalidad (media) obtenido a lo largo del periodo experimental se expresa en la Tabla 3 y Figura 2. Con la utilización de nitrógeno líquido (NL), la vitalidad se sitúa alrededor de 70 % (rango: 85-95%), no existiendo diferencias significativas dentro de cada macho a lo largo de todo el periodo experimental.

Tabla 2: Vitalidad Espermática a lo largo del experimento.

Perros	1	30
Pastor Alemán	88	85
Bóxer	70	65
Labrador	75	70
Media	77.66	73.33

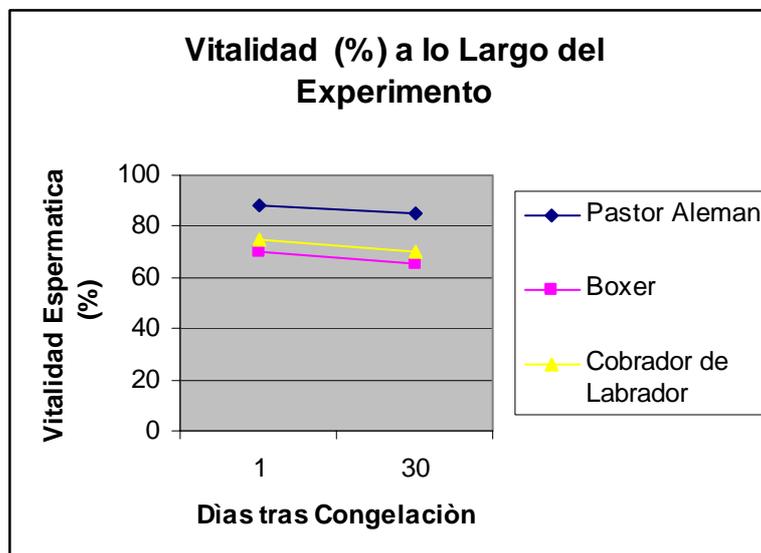


Figura 2; % de Vitalidad a lo largo del experimento

## XII. DISCUSIÓN

Este trabajo experimental muestra, en primer lugar, que los resultados obtenidos in vitro después de congelar y conservar el semen canino con nitrógeno líquido con los extensores caniPRO A & B (NL), confirman plenamente los resultados obtenidos en estudios realizados por otros autores.

Existe un gran número de trabajos que han tratado de establecer la calidad del semen canino, antes y después de la congelación (Olar y col., 1989; Silva y col., 1996; Nöthling y col., 1997; Rigau y col., 2001). La mayoría de esos trabajos de investigación han sido desarrollados utilizando machos de diferentes razas y sólo existen unos pocos trabajos donde la calidad seminal se ha definido en una raza en concreto. En nuestro estudio, en fresco, los valores medios de motilidad y vitalidad eran similares o ligeramente superiores que los descritos para otras razas. Además, el número de morfoanomalías era inferior al 10%, siendo comparable con los resultados descritos por la mayoría de los autores. Sin embargo, la concentración seminal de nuestros machos (valor medio:  $211 \times 10^6$  esp. /ml) esta dentro de los descritos en otros estudios.

La motilidad del semen congelado con nitrógeno líquido (NL) oscilaba entre un 90% durante todo el periodo experimental, siendo nuestros resultados comparables a los obtenidos en otros trabajos que utilizan el nitrógeno líquido (NL) para congelar y conservar semen canino. Dentro de cada ejemplar, la motilidad espermática se modificaba muy ligeramente a lo largo del periodo experimental, indicando que este parámetro seminal permanece inalterable durante un año tras la congelación.

Con respecto a la vitalidad espermática, en la congelación, los valores medios de espermatozoides vivos eran prácticamente similares a los de otros autores. En la mayoría de estudios, tras la congelación, el porcentaje de vitalidad del semen canino variaba entre 70 y 80%. Estos resultados indican que la variabilidad individual tiene menos influencia sobre el porcentaje de vitalidad post-congelación que en el porcentaje de motilidad.

En la mayoría de los estudios, el porcentaje de morfoanomalías alcanza valores entre el 4-5% tras la congelación con nitrógeno líquido. En nuestro

estudio, el porcentaje de morfoanomalías con extensores CaniPro A y B, la el valor medio (4.7%).

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

Los resultados obtenidos en el estudio confirman que el uso de la técnica de congelación con nitrógeno líquido para conservar semen canino es de gran utilidad.

### **XIII. CONCLUSIÓN**

La utilización de diluyentes que permitan conservar el semen canino refrigerado logrando altos porcentajes de espermatozoides vivos con motilidad progresiva e integridad acrosòmica, hará posible el traslado de semen a diferentes puntos del país preservando durante mucho tiempo al animal al mismo tiempo que se pueden hacer varias montas en diferentes partes del mundo y evitar enfermedades.

Hoy en día se ha vuelto mas popular la utilización se semen congelado y la inseminación artificial, gracias a esto se fue mi interés por hacer esta tesis por que cada vez se iba viendo que en las revistas, libros he incluso personas me preguntaban sobre este tema. Así fluyo mi interés y me doy cuenta de que es una muy buena forma de sacarle provecho por ejemplo aun solo animal, y si en bovinos se hace esta practica y hay bancos de semen y tienen éxito, por que en caninos no habría de suceder lo mismo y mas por que en los últimos años se ha despertado el interés por los perros de raza pura.

El diluyente que se utilizo solo es uno de los tantos que se manejan en el mercado y en realidad no tienen un costo elevado para lo que se gana al hacer esta práctica.

El semen congelado a la par con la inseminación artificial están teniendo éxito pero para que esto pueda ser totalmente del agrado de los interesados hay tres factores que en conjunto nos darían una gran respuesta del publico he ir incrementando el interés de los criadores. El primer factor es una buena sincronización del celo de la perra ya sea con ayuda de algún químico, el segundo factor es una buena calidad de semen post-congelación y el tercer factor seria el empleo de una buena técnica para poder depositar el semen.

Hay tantas ventajas al utilizar el semen congelado y es una solución para tantos problemas que acarrea la reproducción.

Ahora en lo personal solo me queda ir distribuyendo esta información pues muchos criadores solo se limitan a la monta natural o al semen fresco y no conocer los beneficios y las ganancias que el semen congelado les produciría.

Mi meta personal es in dando mas auge a este tipo de practica dar a conocer todas las ventajas que hay tanto para el animal como para el dueño.

#### **XIV. LITERATURA CITADA**

1. Allen, E. 1992. Fertility and obstetrics in the dog. Oxford (England): Blackwell Scientific publications limited. p. 1-175.
2. Birchard, S. J. y R. G. Sherding. 1996. Manual Clínico de Pequeñas Especies. Tomo II, México: McGraw-Hill. p. 1044-45.
3. Brown, R. M. 1992. An update of artificial insemination with fresh, chilled, and frozen semen. Probl Vet Med. 4(3): p. 445-52.
4. Burgess, C. M., J. C. Bredl, J. M. Plummer y G. C. England. 2001. Vital and ultrastructural changes in dog spermatozoa during cryopreservation. J Reprod Fertil Suppl. 57: p. 357-63.
5. Corona, C. G. 2001. Evaluación del semen. Colegio de Médicos Veterinarios Zootecnistas Profesionales en Especies Menores de la Comarca Lagunera, A.C. V Congreso Anual; 2001 Mayo 3-5; Torreón, Coahuila. México . sp.
6. Cunningham, J. G. 1999. Fisiología Veterinaria. 2° ed México: McGraw-Hill. p. 561-70.
7. Davol, P. A. 2001. Canine Reproduction. Part 4. Reproduction and the Male Dog. <<http://www.labbies.com/reproduction4.htm>.> [Consulta: 10 de Agosto de 2002]
8. Davol, P. A. 2000. Canine Reproduction. Part 1: Reproduction and the Bitch. <[http://www.labbies.com/canine\\_reproduction\\_table](http://www.labbies.com/canine_reproduction_table).> [Consulta: 10 de Agosto de 2002]
9. Esquivel, L. C. 2002. Reproducción en Pequeñas Especies. Memoria de la XII semana de Ciencia Animal; 2002 28 Octubre - 2 Noviembre; Torreón Coahuila. México. Formato Electrónico.

10. Farstad, W. 2000. Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology*, 53(1): p. 175-86.
11. Fayrer, H. F. 1996. Canine Theriogenology Notes (Male). IAM.  
<<http://lam.vet.uga.edu/LAM/LM000030.HTML#VII.%20%20Sex%20hormone%20alopecias>> [Consulta: 20 de Mayo de 2002]
12. Fontbonne, A. y F. Badinand. 1993. Canine artificial insemination with frozen semen: comparison of intravaginal and intrauterine deposition of semen. *J Reprod Fertil Suppl*, 47: p. 325-7.
13. Foster, R. y M. Smith. 2001. Artificial Insemination (AI). PetEducation.  
<<http://www.peteducation.com/repro/AI.htm>> [Consulta: 25 de Mayo de 2002]
14. Gunzel, A. R. 1986. Sperm collection, evaluation, preservation and artificial insemination in the dog. *Tierarztl Prax*, 14(2): p. 275-82.
15. Hutchison, R. V. 2001. Canine Reproduction for Breeders, Seminar. Company at the 2001 Westminster Kennel Club Show.
16. <<http://www.amchessieclub.org/conception.html>> [Consulta: 6 de Julio 2002]
17. Iguer-ouada, M. y J. P. Verstegen. 2001a. Evaluation of the "Hamilton Thorn computer-based automated system" for dog semen analysis. *Theriogenology*, 55(3): p. 733-49.
18. Iguer-ouada, M. y J. P. Verstegen. 2001b. Long-term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology*, 55(2): p. 671-84

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

29. <<http://www.visionveterinaria.com/historia/04dic2001.htm>> [Consulta: 25 de Agosto de 2002]
30. Pinto, C. R., D. L. Paccamonti y B. E. Eilts. 1999. Fertility in bitches artificially inseminated with extended, chilled semen. *Theriogenology*, 52(4): p. 609-16.
31. Purswell, B. J. y N. A. Parker. 2000. Modern breeding management in dogs. *Veterinary Medicine*.
32. <<http://www.hilltopanimalhospital.com/modern%20breeding%20management.htm>> [Consulta: 29 de Septiembre de 2002]
33. Rota, A., A. Frishling, I. Vannozzi, F. Camillo y S. Romagnoli. 2001. Effect of the inclusion of skimmed milk in freezing extenders on the viability of canine spermatozoa after thawing. *J Reprod Fertil Suppl*, 57: p. 377-81.
34. Ruckebusch, Y., L. P. Phaneuf y R. Dunlop. 1991. Fisiología de pequeñas y grandes especies. México, D.F.: El Manual Moderno, S.A. de C.V. p. 600-26.
35. Silva, L. D., K. Onclin, B. Lejeune y J. P. Verstegen. 1996. Comparisons of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen. *Vet Rec*, 138(7): p. 154-7.
36. Sirivaidyapong, S., P. Ursem, M.M. Bevers y B. Colenbrander. 2001. Effect of prostatic fluid on motility, viability and acrosome integrity of chilled and frozen-thawed dog spermatozoa. *J Reprod Fertil Suppl*, 57: p. 383-6.
37. Sisson, S., J. D. Grossman y R. Getty. 1993. Anatomía de los animales domésticos. 5° ed. Tomo II, México: Salvat. p. 1728-41.

38. Stornelli, M. A., M. C. Stornelli, M. S. Arauz y L. Sota. 2001. Inseminación artificial con semen fresco, refrigerado y congelado. Aplicación y desarrollo en caninos. ANALECTA VETERINARIA, 21, 1: p. 58 –66.
39. Strom, H. B., B. Larsson, C. B. Linde-Forsberg y H. Rodriguez. 2000. Evaluation of chilled and frozen-thawed canine spermatozoa using a zona pellucida binding assay. J Reprod Fertil Suppl, 119(2): p. 201-6.
40. Thomassen, R., W. Farstad, A. Krogenaes, J. A. Fougner y K. A. Berg. 2001. Artificial insemination with frozen semen in dogs: a retrospective study. J Reprod Fertil Suppl, 57: p. 341-6.
41. Villalba, G. A. 1997. La inseminación artificial. Infomascota.
42. <<http://www.infomascota.com>> [Consulta: 30 de Abril de 2002]
43. Wilson, M.S. 2001. Transcervical insemination techniques in the bitch. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 31(2): p. 291-304.
44. García, V. A. Inseminación artificial. Federación Canofila Mexicana. [www.fcm.org.mx/invest/inseminacion.shtml](http://www.fcm.org.mx/invest/inseminacion.shtml) [Consulta: 29 de Octubre de 2008]