

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**“REFRIGERACIÓN DE SEMEN CANINO CON EL
KIT COMERCIAL CANIPRO™ CHILL 10”**

TESIS ELABORADA POR:

DANIEL EDUARDO GÓMEZ PÉREZ

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

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA.

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

JUNIO DEL 2011

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"
UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



"REFRIGERACIÓN DE SEMEN CANINO CON EL
KIT COMERCIAL CANIPRO™ CHILL 10"

TESIS ELABORADA POR:

DANIEL EDUARDO GÓMEZ PÉREZ

ASESOR PRINCIPAL

Una firma manuscrita en tinta que dice "Carlos Raúl Rascón Díaz".

MVZ. CARLOS RAÚL RASCÓN DÍAZ

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

JUNIO DEL 2011

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"
UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



"REFRIGERACIÓN DE SEMEN CANINO CON EL
KIT COMERCIAL CANIPRO™ CHILL 10"

TESIS ELABORADA POR:

DANIEL EDUARDO GÓMEZ PÉREZ

ASESOR PRINCIPAL

MVZ. CARLOS RAÚL RASCÓN DÍAZ

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN
REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

MVZ. RODRIGO I. SIMÓN ALONSO



Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

JUNIO DEL 2011

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"
UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



PRESIDENTE DEL JURADO

MVZ. CARLOS RAÚL RASCÓN DÍAZ

PRIMER VOCAL

MC. MENDOZA RAMOS MARGARITA YOLANDA

SEGUNDO VOCAL

IZ. JORGE HORACIO BORUNDA RAMOS

VOCAL SUPLENTE

MC. JORGE ITURBIDE RAMÍREZ

AGRADECIMIENTOS

A DIOS PADRE POR LAS BENDICIONES RECIBIDAS

MI FAMILIA LA CUAL ME BRINDO LA CONFIANZA, APOYO Y ORACIONES PARA MI OPTIMO DESARROLLO.

A MIS AMIGOS Y CONOCIDOS EN GENERAL, DEL NORTE, CENTRO Y SUR DEL PAÍS. ME ENCANTARÍA MENCIONARLOS UNO POR UNO, PERO OMITIR UNO SERIA TERRIBLE. POR LO TANTO ELLO SABEN PERFECTAMENTE A QUIENES ME REFIERO.

A MIS MAESTROS, ASESORES, ENTRENADORES, Y DEMÁS PERSONAL QUE TUVO LA ATENCIÓN DE BRINDARME SU TIEMPO Y DISPOSICIÓN EN MÚLTIPLES OCASIONES.

A MIS ASESORES DE TESIS.
MVZ. CARLOS RAÚL RASCÓN DÍAZ.

A MI AMIGO MVZ. CARLOS RAÚL RASCÓN DÍAZ. GRACIAS POR SU AMISTAD, APOYO Y ASESORÍA EN MI ESTANCIA EN TORREÓN, EN MI DESARROLLO PERSONAL Y EN LA ELABORACIÓN DE ESTA TESIS. YA QUE JUNTOS VIVIMOS A LO LARGO DE ESTE TIEMPO MIS Y SUS BUENOS Y MALOS MOMENTOS. DE CORAZÓN LE AGRADEZCO POR ESO.

QUÍMICA MARGARITA GRACIAS POR TODO.

A MI JURADO:
MVZ. CARLOS RAÚL RASCÓN DÍAZ.
MC. MARGARITA YOLANDA MENDOZA RAMOS
IZ. JORGE HORACIO BORUNDA RAMOS
MC. JORGE ITURBIDE RAMÍREZ

DEDICATORIA

A MIS PADRES:

La concepción de este proyecto está dedicada a mis padres, pilares fundamentales en mi vida. Sin ellos, jamás hubiese podido conseguir lo que hasta ahora. Su tenacidad y lucha insaciable han hecho de ellos el gran ejemplo a seguir y destacar, no solo para mí, sino para mis hermanos y familia en general. A ellos este proyecto, que sin ellos, no hubiese podido ser.

A MI MADRE ROSA MARÍA PÉREZ GAYTAN

Con mucho amor y cariño le dedico todo mi esfuerzo y trabajo puesto para la realización de esta tesis.

A MI PADRE DR. RODOLFO GÓMEZ VERDÍN

Quien velo en todo momento por mi formación y desarrollo integro como persona y profesionista.

A MIS HERMANOS:

Punto referente en la conservación del vinculo familiar, ya que siendo mis intermediarios e informadores de las eventualidades que ocurrían en mi casa mientras yo me encontraba lejos. Gracias por su esfuerzo, paciencia, y comprensión.

RESUMEN

Se realizó un estudio de semen refrigerado en caninos, con la técnica de CANIPRO™ CHILL 10 con el fin de comparar, evaluar la motilidad y anomalías primarias y secundarias del semen refrigerado; y compararlo con el semen fresco; para verificar el resultado del proceso utilizado; por otra parte se comprobará por medio de la inseminación artificial en otro estudio comprobando la calidad espermática con el porcentaje de gestación obtenida. Este experimento alterno será realizado por el tesista EMVZ. Alejandra de Jesús González Reveles.

En el estudio se utilizaron 5 machos, con diferente peso, raza, edad y clínicamente sanos. El estudio para este experimento fue realizando un examen de calidad espermática (motilidad, morbilidad, morfoanomalías), aceptando los animales que tuvieran por lo menos una concentración de 200 millones de espermatozoides por mililitro; siendo este el promedio normal en caninos, sabemos que aun en el límite mínimo de concentración tenemos riesgo de que de la inseminación se verá afectada.

Para realizar esta técnica, se utilizó el kit comercial CANIPRO™ CHILL 10 para la refrigeración del semen; las características microscópicas en el semen fresco fueron prácticamente similares entre machos; sin embargo, tras el proceso de refrigeración, se observaron diferencias entre individuos en la calidad seminal, especialmente en la motilidad espermática, la cual disminuyó paulatinamente conforme el experimento avanzó entre un 5% a 8% por día.

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

Los resultados *in vitro* obtenidos en el estudio confirmaron que el uso de la refrigeración del semen es una alternativa potencial para conservar semen canino durante periodos cortos de tiempo. Concluyendo así, la técnica con semen refrigerado a diez días es eficiente y es de gran utilidad cuando tenemos un

número mayor de hembras en las cuales podemos dosificar la cantidad de semen obtenido para posteriormente utilizarla.

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.

En la especie canina, se han desarrollado diferentes protocolos de crío preservación seminal utilizando diferentes tipos de diluyentes (Dobrinski y col., 1992; Fontbonne y Badinand, 1993; Nöthling y col., 1997; Ström y col., 1999) El porcentaje de fertilidad tras realizar una inseminación con semen refrigerado 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 pos refrigeración, (Peña y col., 2003). Por tanto, parece necesario desarrollar nuevas técnicas de crío preservación seminal para obtener mayores porcentajes de fertilidad tras la realización de una inseminación artificial con semen refrigerado. 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 crío preservación de semen ha hecho posible la distribución por el mundo de material genético a un bajo costo. Diversas metodologías de crío preservación 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.).

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 refrigerado 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 refrigeración, 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 (9, 10, 11, 12, 13). Estos hechos se relacionan tanto con las particularidades de la fisiología reproductiva de la hembra como con la especial sensibilidad del semen canino a los procesos de crió preservación y la falta de desarrollo en esta área. (12, 14). Es así que son necesarias investigaciones dirigidas a mejorar la habilidad para mantener la capacidad fecundante del semen refrigerado en caninos y obtener así tasas de preñez y tamaños de camada satisfactorios. (15, 16).

PALABRAS CLAVE:

- CANIPRO™ CHILL 10.
- Reproducción Canina
- Semen Canino.
- Refrigeración de Semen.
- Inseminación Artificial.
- Motilidad espermática.

ÍNDICE

| | |
|--|----------|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| I. ANTECEDENTES | 2 |
| II. ANATOMÍA DEL APARATO REPRODUCTOR DEL PERRO | |
| 2.1. Órganos genitales del macho | 3 |
| 2.1.1. Escroto | 3 |
| 2.1.2. Testículos | 3 |
| 2.1.3. Epidídimo..... | 3 |
| 2.1.4. Conductos deferentes..... | 3 |
| 2.1.5. Cordón espermático (funículos espermáticos) | 4 |
| 2.1.6. Canal inguinal..... | 4 |
| 2.2. Glándulas genitales accesorias | 4 |
| 2.2.1. Glándulas vesiculares..... | 4 |
| 2.2.2. Próstata | 5 |
| 2.2.3. Glándulas bulbouretrales..... | 5 |
| 2.3. Genitales externos..... | 5 |
| 2.3.1. Pene | 5 |
| 2.3.2. Prepucio | 6 |
| 2.3.3. Uretra masculina..... | 6 |
| | |
| III. ENDOCRINOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN | |
| 3.1 Hormonas Hipotalámicas..... | 7 |
| 3.1.1 Hormona Liberadora de Gonadotropina (GnRH) | 7 |
| 3.2 Hormonas Hipofisarias..... | 7 |
| 3.2.1 Hormona Folículo Estimulante (FSH) | 7 |
| 3.2.2 Hormona Luteinizante (LH) | 8 |
| 3.2.3 Prolactina..... | 8 |
| 3.3 Hormonas Foliculares..... | 9 |
| 3.3.1 Estrógenos | 9 |

| | |
|---------------------------|----|
| 3.3.2 Progesterona | 9 |
| 3.3.3 Prostaglandina..... | 10 |
| 3.3.4 Andrógenos | 10 |
| 3.3.5 Inhibina | 10 |

V. FISIOLÓGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

| | |
|--|----|
| 4.1. Fisiología de la Reproducción del Macho | 11 |
| 4.1.1. Espermatogénesis | 11 |
| 4.1.2. Control de la temperatura | 12 |
| 4.1.3. Transporte del semen..... | 13 |
| 4.1.4. Erección..... | 13 |
| 4.1.5. Eyaculación | 14 |

V. PROTOCOLO DE CONSERVACIÓN.

| | |
|--|----|
| 5.1 Dilución y empleo de crioprotectores..... | 15 |
| 5.1.1 Situación actual de los procesos de refrigeración y congelación para el semen canino..... | 17 |
| 5.2 Papel de los crioprotectores | 19 |
| 5.2.1 Yema de huevo | 20 |

VI. IMPACTO DE LA REFRIGERACIÓN Y CONGELACIÓN EN LA ESTRUCTURA Y FUNCIÓN ESPERMÁTICA

| | |
|--|----|
| 6.1 Susceptibilidad al choque térmico | 22 |
| 6.2 Alteraciones morfo-funcionales derivadas de la refrigeración | 26 |
| 6.2.1 Refrigeración..... | 26 |

VII. CARACTERÍSTICA DEL SEMEN FRESCO Vs. REFRIGERADO

| | |
|--|----|
| 7.1 Semen fresco vs. Refrigerado | 28 |
| 7.1.1. Semen Fresco | 28 |
| 7.1.2. Semen Refrigerado..... | 29 |

| | |
|-----------------------------|-----------|
| VIII. OBJETIVOS..... | 30 |
|-----------------------------|-----------|

| | |
|---------------------------|-----------|
| IX. HIPÓTESIS..... | 31 |
|---------------------------|-----------|

| | |
|-----------------------------------|-----------|
| X. MATERIAL Y MÉTODOS..... | 32 |
|-----------------------------------|-----------|

| | |
|--------------------|----|
| 10.1 Material..... | 32 |
|--------------------|----|

| | |
|--------------------------------|----|
| 10.2 Evaluación del Macho..... | 32 |
|--------------------------------|----|

| | |
|----------------------------|-----------|
| XI. RESULTADOS..... | 34 |
|----------------------------|-----------|

| | |
|----------------------------|-----------|
| XII. DISCUSIÓN..... | 37 |
|----------------------------|-----------|

| | |
|------------------------------|-----------|
| XIII. CONCLUSIÓN..... | 39 |
|------------------------------|-----------|

| | |
|-------------------------------|-----------|
| LITERATURA CITADA..... | 40 |
|-------------------------------|-----------|

ÍNDICE DE CUADROS Y/O TABLAS

| | |
|--|----|
| CUADRO No 1. RELACIÓN DE SEMEN CON EL EXTENSOR CANIPRO™ CHILL 10..... | 33 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| TABLA No. 1. MEDIA DE VOLUMEN, CONCENTRACIÓN, PORCENTAJE DE MOTILIDAD, VIABILIDAD Y MORFOLOGÍA EN LOS EYACULADOS DE LOS EJEMPLARES UTILIZADOS..... | 34 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| TABLA No. 2: MOTILIDAD ESPERMÁTICA DEL SEMEN CANINO A LAS 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216 Y 240 HORAS, PORCENTAJE INICIAL Y FINAL DEL EXPERIMENTO..... | 35 |
|--|----|

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| ESTRUCTURA DE LA MEMBRANA CELULAR DEL ESPERMATOZOIDE Y DE LAS ALTERACIONES INDUCIDAS POR EL CHOQUE TÉRMICO (TORNADO DE SERRES, 2003)..... | 24 |
|---|----|

ÍNDICE DE GRÁFICOS

| | |
|---|----|
| GRAFICA 1. COMPORTAMIENTO DIARIO DE LA MOTILIDAD (MEDIA A LO LARGO DEL PERIODO EXPERIMENTAL)..... | 35 |
| GRAFICA LINEAL DEL COMPORTAMIENTO DIARIO DE CADA DONADOR EN LOS DIEZ DÍAS..... | 36 |

INTRODUCCIÓN

En los últimos 20 años, las técnicas de inseminación artificial y preservación 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 refrigerado, 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 refrigerado puede ver reducida su capacidad fértil (Rijsselaere y col., 2002). La prueba definitiva para evaluar la fertilidad del semen canino refrigerado mediante cualquier protocolo de crío preservación 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 refrigerado 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-refrigeración parece ser el mejor indicador de la fertilidad seminal (Nöthling y col., 1997).

I .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 crío preservación de semen puede ser implementado con bajo costo, fácil manejo y moderada infraestructura, mejorando así las posibilidades del uso del semen de reproductores valiosos (28).

La prueba definitiva para evaluar la fertilidad del semen canino refrigerado mediante cualquier protocolo de crío preservación 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 refrigerado 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-refrigeración 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 una prueba seminal de los eyaculados de machos diferentes (<biblio>), por lo que resulta imposible establecer si existe variación individual. Por tanto, parece necesario desarrollar nuevas técnicas de crío preservación seminal para obtener mayores porcentajes de fertilidad tras la realización de una inseminación artificial con semen refrigerado.

II. ANATOMÍA DEL APARATO REPRODUCTOR DEL PERRO

2.1. Órganos genitales del macho

2.1.1. Escroto

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

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

2.1.2. Testículos

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

2.1.3. Epidídimo

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

2.1.4. Conductos deferentes

Los conductos deferentes, son la continuación de la cola del epidídimo, con una ampolla estrecha en el perro y entran a la superficie 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).

2.1.5. 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).

2.1.6. Canal inguinal

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

2.2. Glándulas genitales accesorias

2.2.1. Glándulas vesiculares

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

2.2.2. Próstata

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

2.2.3. Glándulas bulbouretrales

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

2.3. Genitales externos

2.3.1. Pene

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

El glande es muy grande y se extiende sobre toda la longitud del pene; su parte craneal, llamada *pars longa glandis*, es cilíndrica, con un extremo libre puntiagudo, constituye las tres cuartas partes distales del glande y termina en la abertura de la uretra; caudalmente existe un alargamiento redondeado, llamado

bulbo del glande, que sin erección es difícil de apreciar, pero que cuando el pene se encuentra en erección consiste en un abultamiento más o menos esférico responsable de la fijación del pene en la vagina de la perra durante el apareamiento (Allen, 1992; Sisson *et al.*, 1993).

2.3.2. Prepucio

El prepucio forma una vaina completa alrededor de la parte craneal del pene (Sisson *et al.*, 1993). Cubre completamente el pene no erecto (Allen, 1992). La capa más externa es ordinariamente integumento. Las capas internas son delgadas, de color rojizo y aglandulares. Presenta una mucosa que se continúa con la mucosa del pene en el glande peniano. En estas capas hay muchos nódulos linfáticos, que son especialmente grandes y a menudo prominentes en el fondo de la cavidad prepucial (Allen, 1992; Sisson *et al.*, 1993).

2.3.3. Uretra masculina

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

I. ENDOCRINOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

En los mamíferos, el proceso reproductivo está controlado por dos sistemas reguladores. El sistema endocrino y el nervioso tienen, cada uno, un papel específico, y es esencial una interacción sutil entre ambos para que se desarrollen de forma exitosa los eventos necesarios para un nacimiento y cría de una descendencia sana.

3.1. Hormonas Hipotalámicas

3.1.1. Hormona liberadora de Gonadotropina (GnRH)

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

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

3.2. Hormonas Hipofisiarias

3.2.1. Hormona Folículo Estimulante (FSH)

Es sintetizada y liberada en la adenohipófisis por estimulación de la hormonaliberadora de gonadotropinas hipotalámicas (GnRH) (Ruckebusch *et al.*, 1991).

En la hembra es la responsable de estimular el desarrollo de los folículos en los ovarios (Allen, 1992; Ruckebusch *et al.*, 1991). No han sido bien determinadas las concentraciones circulantes en la perra (Allen, 1992). La síntesis y liberación de Hormona Folículo Estimulante (FSH), está bajo la influencia de altas concentraciones sostenidas de estradiol. Por el contrario una elevación de progesterona aumenta la producción de GnRH, estimula la producción de FSH (Ruckebusch *et al.*, 1991). En el macho es responsable de la estimulación de algunos de los procesos en la espermatogénesis (Allen, 1992; Ruckebusch *et al.*, 1991).

3.2.2. Hormona Luteinizante (LH)

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

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

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

3.2.3. Prolactina

Producida y liberada por la adenohipófisis. Actúa sobre la glándula mamaria para estimular la producción de leche. Sus concentraciones en sangre suelen

aumentar de acuerdo a la disminución de las concentraciones de progesterona, aunque en algunos casos la progesterona puede estimular la liberación de prolactina. La prolactina también es considerada luteotrófica (mantiene el funcionamiento del cuerpo lúteo) (Allen, 1992).

3.3. Hormonas foliculares

3.3.1. Estrógenos

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

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

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

3.3.2. Progesterona

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

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

3.3.3. Prostaglandinas

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

3.3.4. Andrógenos

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

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

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

3.3.5. Inhibina

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

IV FISIOLÓGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

4.1. Fisiología de la Reproducción del Macho

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

4.1.1. Espermatogénesis

Constituye un proceso complejo mediante el cual se producen los espermatozoides (células germinativas masculinas) en los tubos seminíferos de los testículos (Allen, 1992; Cunningham, 1999; Davol, 2001). Las células llamadas *espermatogonias*, que son las precursoras de los espermatozoides, se dividen de forma normal (mitosis) para dar origen a muchos *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).

4.1.2. Control de la temperatura

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

- a) Los testículos se alojan fuera de la cavidad corporal en el saco escrotal.
- b) El músculo cremáster puede influir sobre la distancia que media entre el cuerpo y el testículo.

- c) El músculo dartos en la pared escrotal puede influir sobre el tamaño del escroto y, en consecuencia, sobre la posición de los testículos.
- d) La disposición de los vasos sanguíneos en el cordón espermático permite la refrigeración de la sangre arterial mediante el retomo sanguíneo en el plexo pampiniforme.

4.1.3. Transporte del semen

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

4.1.4. Erección

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

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

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

4.1.5. Eyaculación

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

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

- *Primera fracción:*

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

- *Segunda fracción*

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

5. PROTOCOLO DE CONSERVACION

5.1 Dilución y empleo de crioprotectores

Tras la obtención del semen, el primer paso a seguir es la dilución en un medio adecuado para la supervivencia de las células durante su procesado y conservación. El tipo de diluyente elegido y los ritmos específicos de refrigeración, congelación y descongelación son factores altamente importantes en la calidad del

semen calentado o descongelado, pues influyen la morfología y la motilidad de los espermatozoides y éstas, a su vez, influyen los índices de concepción tras la inseminación artificial. En esencia, los diluyentes deberán mantener la osmolaridad, el pH y la concentración adecuada de iones del eyaculado. Es fundamental que el diluyente aporte una fuente de energía y proteja a los espermatozoides de los daños causados por la congelación y la descongelación (England, 1993) y también por la refrigeración y posterior calentamiento (Province y col., 1984; Bouchard y col., 1990).

Existen referencias de inseminaciones artificiales en la perra de los siglos dieciocho practicadas por Spallanzani y diecinueve por Rissi y Heape (Oettlé, 1993). Los primeros trabajos publicados sobre conservación del eyaculado de perro mediante refrigeración son de 1952 (Brochart y Coulomb, 1952), mientras que el primer registro de inseminación artificial exitosa con semen diluido y refrigerado data de 1954 (Harrop, 1954). Los diluyentes utilizados en estos estudios contenían yema de huevo con solución de citrato de sodio o fructosa (Brochart y Coulomb, 1952), o bien la leche pasteurizada (Harrop, 1954). Tras estos trabajos, otros autores aportaron más conocimientos sobre los efectos de distintos diluyentes en la refrigeración del semen de perro (Foote, 1964; Foote y Leonard, 1964; Gill y col., 1970; Seager y Fletcher, 1972). En 1975, Andersen adaptó al semen canino el diluyente TRIS-Fructosa-Ácido Cítrico con 20% de yema de huevo y glicerol al 8%; sin embargo, hoy se considera que para la conservación en refrigeración del semen de perro está desaconsejado el uso de glicerol, ya que presenta un efecto depresivo en la motilidad (Province y col., 1984).

En los años 80 y 90 los diluyentes utilizados para refrigeración estaban constituidos esencialmente por yema de huevo o leche (Province y col., 1984; Bouchard y col., 1990). Tanto la yema de huevo como la leche aportan lipoproteínas de baja densidad, principalmente fosfolípidos que actúan estabilizando las membranas nucleares sin que se produzcan cambios aparentes en la composición de las mismas (Parks y Graham, 1992).

La primera referencia de inseminación artificial exitosa con semen congelado de perro data de 1969 y fue realizada por Seager, consiguiéndose el nacimiento de

2 cachorros tras deposición intra-vaginal del semen. La misma técnica de inseminación fue empleada en los trabajos siguientes del mismo autor (Seager y Fletcher, 1973), y por Andersen (1972); pero los malos resultados de este último hicieron que el autor diera importancia al lugar de deposición del semen, así que optó por la deposición intra-uterina a través del canal cervical con el auxilio de un espéculo apropiado y de un catéter metálico (Andersen, 1975), que se conoce como catéter transcervical escandinavo.

En los primeros trabajos sobre congelación de semen de perro se utiliza el formato de pellets o píldoras (Seager, 1969), mientras que en los trabajos posteriores Andersen (1972; 1975) emplea pajuelas de polivinilpirrolidona para el envasado y almacenamiento del semen. Pese a que los trabajos relacionados con la congelación en pellets refieren resultados exitosos (Thomas y col., 1993) se reconoce actualmente que es preferible la utilización de las pajuelas, ya que los pellets comportan un mayor riesgo de contaminaciones, por agentes infecciosos o por espermatozoides de otros perros; además del inconveniente de que su identificación es más difícil (Linde-Forsberg, 2002). También es unánimemente reconocido que la utilización de las pajuelas permite un mejor control de la descongelación.

5.1.1 Situación actual de los procesos de refrigeración y congelación para el semen canino

En las distintas especies domesticas, incluida la especie canina, se han realizado una considerable cantidad de investigaciones con el objetivo de mejorar la viabilidad y la motilidad del semen preservado y, consecuentemente, la fertilidad. Para ello, los protocolos de refrigeración y congelación han sido objeto de distintos estudios sobre el uso de distintos diluyentes, diferentes proporciones de crioprotectores, ritmos de refrigeración, equilibrio y protocolos de congelación y descongelación (Salamon y Maxweel, 1995; Farstad, 1996), llevados a cabo por diversos grupos de investigación en las dos últimas décadas. Los avances en los equipamientos y en las técnicas de evaluación del semen han posibilitado analizar y conocer más ampliamente el impacto de los diluyentes en la longevidad,

motilidad y velocidad de los espermatozoides tras la refrigeración (Rota y col., 1995; England y Ponzio, 1996; Pinto y col., 1999; Iguer-Ouada y Verstegen, 2001a) y la congelación (Silva y Verstegen, 1995; Rota y col., 1997; 2001; Szász y col., 2000a).

En la actualidad, el diluyente de semen canino más utilizado en situaciones prácticas y experimentales sigue siendo el TRIS-Fructosa-Ácido Cítrico, con 20% de yema de huevo y glicerol al 8%, si se pretende la congelación (Dobrinski y col., 1993; Silva y Verstegen, 1995; Rota y col., 1997), diluyente éste conocido por proporcionar índices de concepción razonables. Sin embargo, las investigaciones más recientes estudian las posibilidades de suplementación de este diluyente con diversos azúcares como la trehalosa, la xilosa y la maltosa (Yildiz y col., 2000), metilxantinas como la pentoxifilina (Koutsarova y col., 1997) y detergentes biológicos como la Pasta Equex (Rota y col., 1997, 1999b; Peña y col., 1998c; Tsutsui y col., 2000 a,b; Peña y Linde-Forsberg, 2000; Peña y col., 2003a); los únicos aminoácidos estudiados en esta especie han sido la prolina y la glicina-betaína (Peña y col., 1998a), obteniéndose con la adición de prolina buenos resultados post-descongelación.

Los estudios más recientes siguen investigando y comparando los protocolos de congelación a fin de mejorar la supervivencia espermática post-descongelación. Pero no podemos olvidar, para obtener un elevado porcentaje de nacimientos en esta especie, la necesidad de una rigurosa monitorización del ciclo estral de la perra y el uso de una apropiada técnica de deposición intra-uterina del semen descongelado; factores éstos tan importantes como el método utilizado en la criopreservación.

El uso de semen congelado fue aprobado por el AKC (American Kennel Club) en 1981, y tras 6 años y medio se contabilizaron 101 registros de camadas (Concannon y Battista, 1989). La dificultad en canalizar el cérvix canino para realizar la inseminación intra-uterina puede ser el origen del poco interés suscitado hasta entonces por la congelación del semen de esta especie (Smith, 1986), pero los autores coinciden en que este método proporciona resultados bastante más satisfactorios (Fontbonne y Badinand, 1993). Durante el año 2000 el AKC registró

658 camadas obtenidas con semen congelado, lo que denota la existencia de un gran interés entre los criadores por estas técnicas, en la actualidad (Linde-Forsberg, 2002). En la bibliografía se encuentran referenciados índices de nacimientos tras inseminación intra-uterina con semen descongelado del orden de 67% y 74% (Farstad, 1984; 1996) y de 73,6% (Fontbonne y Badinand, 1993).

5.2 Papel de los crioprotectores

El proceso de criopreservación ideal debe preservar, en la mayor proporción posible, la integridad de las diferentes estructuras del espermatozoide (Watson, 1995). La utilización de un agente crioprotector es indispensable en la minimización de los daños que se producen en los espermatozoides durante el proceso de criopreservación (Gao y col., 1995); pues los crioprotectores tienen efectos notables sobre los fenómenos que acompañan a la congelación y la descongelación de las células vivas, proporcionando protección contra las fuertes alteraciones que se producen en las estructuras celulares y extra-celulares y en la composición química (Fahy y col., 1990).

La yema de huevo y la leche han sido los primeros componentes utilizados para preservar a los espermatozoides del efecto del frío. Éstas son sustancias crioprotectoras puesto que durante los procesos de refrigeración y congelación (Pickett y Komarek, 1966) minimizan la pérdida de los lípidos de membrana aportándole fosfolípidos de bajo peso molecular (Graham y Foote, 1987). Los crioprotectores se han clasificado según su capacidad para atravesar la membrana: en penetrantes como glicerol, DMSO, etilenglicol, y en no-penetrantes incluyendo determinados azúcares (Hammerstedt y col., 1990). Como se describe mas adelante, en la actualidad se incorporan a los diluyentes otras sustancias como detergentes y aminoácidos, combinadas generalmente con glicerol, esperando preservar mejor la capacidad motil y fecundante de los espermatozoides en los procesos de refrigeración y congelación.

5.2.1. Yema de huevo

La yema de huevo es un componente básico que está presente en casi todos los diluyentes para refrigeración y congelación, cuyas características protectoras contra el frío son conocidas desde los trabajos de Phillips y Lardy (1940). Debido a la compleja naturaleza de la yema, los investigadores se encontraron con dificultades para determinar los factores específicos responsables de los efectos beneficiosos y de su modo de actuación; Kampschmidt y col. (1953) precisaron que la yema contribuía beneficiosamente de dos maneras distintas: por resistencia, protegiendo contra el choque térmico y por conservación, consiguiendo la supervivencia del espermatozoide. Así, la porción lipídica constituida por los fosfolípidos, lecitina y cefalina, es efectiva en la protección contra el choque térmico; hecho confirmado por Blackshaw (1954), quien precisó que la lecitina era el principal fosfolípido protector. También Quinn y White (1966), constataron que la lecitina impide el influjo y la acumulación de Ca^{2+} en el espermatozoide de toro y morueco. Durante el tiempo en que se desarrolló esta investigación sobre el empleo de la yema de huevo, algunos trabajos atribuyen la actividad protectora de la yema, contra los choques térmicos y la pérdida de motilidad, a la interacción con la membrana (Watson, 1975a), más concretamente, a la débil interacción de los fosfolípidos de la yema con la membrana plasmática (Quinn y col., 1980).

Además de Graham y Foote (1987) han sustentado que las lipoproteínas de baja densidad son los componentes de la yema que consiguen el efecto crioprotector, evitando el choque térmico y preservando la integridad de la membrana (Pace y Graham, 1974; Foulkes, 1977; Watson, 1981b).

También se atribuyen a la yema propiedades protectoras contra los efectos tóxicos del plasma seminal que desestabilizan la membrana del espermatozoide. De modo que, la cantidad de yema contenida en el diluyente debería ser proporcional a la cantidad de plasma seminal en el semen diluido. Así, en casos en que el semen esté muy diluido existe, consecuentemente, una reducida

concentración de plasma seminal y por ello, las concentraciones de yema pueden ser reducidas sin impacto negativo en la fertilidad (Shannon y Curson, 1983 a; b).

La estabilización de la membrana del espermatozoide humano por efecto de la yema ha sido también confirmada por los trabajos de Bielfeld y col. (1990); quienes comprobaron que la eliminación de la yema por lavado originaba un aumento significativo del número de espermatozoides con reacción acrosómica, siendo posible que mientras la yema se elimina haya una aceleración en la pérdida de colesterol y fosfolípidos, lo que causaría la desestabilización de la membrana y, de este modo, la reacción acrosómica.

Las investigaciones posteriores sobre la naturaleza de esta protección han revelado que la fracción catiónica e hidrosoluble de la yema, debido a su carga, compite con los péptidos catiónicos del plasma seminal en la unión a la membrana del espermatozoide, evitando los efectos negativos de los péptidos (Vishwanath y col., 1992). Otro trabajo reciente se refiere nuevamente a las lipoproteínas de baja densidad, esta vez, como responsables del secuestro de las proteínas del plasma seminal en el semen de toro (Manjunath y col., 2002).

VI. IMPACTO DE LA REFRIGERACIÓN Y CONGELACIÓN EN LA ESTRUCTURA Y FUNCIÓN ESPERMÁTICA.

La reducida fertilidad del semen descongelado se atribuye principalmente a las alteraciones en la estructura y función de la membrana durante los procesos de refrigeración, congelación y descongelación (Parks y Graham, 1992). En trabajos realizados con eyaculados de morueco, se observa que tras el proceso de congelación y descongelación solamente entre el 40 y 60 % de los espermatozoides preservan su motilidad, aunque apenas un 20-30% se mantienen biológicamente íntegros. Ésto es indicativo de que la motilidad y la estructura del espermatozoide se afectan en distinto grado, desconociéndose si las alteraciones se producen simultáneamente o en distintas fases del proceso de congelación y descongelación (Salamon y Maxwell, 1995).

6.1 Susceptibilidad al choque térmico

Uno de los problemas más evidentes en los procesos de conservación del semen es el conjunto de alteraciones en el espermatozoide, designadas colectivamente como “choque térmico”. Dichas alteraciones se ponen en evidencia por la pérdida irreversible de viabilidad que se produce cuando el espermatozoide se enfría rápidamente a 0°C y cuya señal más evidente es la pérdida de motilidad tras el calentamiento (Quinn y White, 1966); observándose movimientos circulares de los espermatozoides y pérdida precoz de la motilidad. Además se observan otras lesiones como son la disminución de la producción energética y el aumento de la permeabilidad de la membrana (Watson, 1981a). Debido a este fenómeno, la refrigeración previa a la congelación se lleva habitualmente a cabo con mucha precaución, de modo que el enfriamiento se realiza lentamente, aunque ésto no evita que los cambios de temperatura originen alteraciones en las membranas (Watson, 2000).

La bibliografía consultada demuestra que el espermatozoide se hace susceptible al choque térmico en la región proximal del cuerpo del epidídimo,

cuando la gota citoplasmática se mueve en dirección a la porción distal de la pieza intermedia; por tanto, durante la maduración del espermatozoide en el epidídimo, éste adquiere la motilidad pero también la susceptibilidad al choque térmico (White, 1993).

Existen evidencias de que el choque térmico y las lesiones irreversibles asociadas Resultan de alteraciones en la organización de los lípidos de la membrana del espermatozoide o fases de transición lipídica (Drobnis y col., 1993). A la temperatura fisiológica, los fosfolípidos de membrana están en un estado más o menos fluido y sus cadenas de ácidos grasos son flexibles (De Leeuw y col., 1990). Se sabe que algunos lípidos de la membrana del espermatozoide, los lípidos no-bicapa, asumen una disposición hexagonal, estando implicados en la formación de un anillo alrededor de las proteínas que integran la membrana (Parks y Graham, 1992). Así que, la temperatura de la membrana disminuye por debajo de la temperatura de transición de cada uno de los fosfolípidos individuales que la componen. Éstos sufren la fase de transición termotrópica del estado líquido-cristalino al estado gel, comenzando a agregarse (Quinn, 1989). Concretamente, las cadenas de ácidos grasos toman rigidez y se aíslan en dominios de gel, de los cuales son excluidas las proteínas de la membrana que se concentran en áreas fluidas; como se ha demostrado mediante microscopía electrónica (De Leeuw y col., 1990). Este fenómeno afecta las funciones de las proteínas, por ejemplo, en los canales proteicos iónicos (Watson, 2000).

Los lípidos no-bicapa son los que probablemente sufren en primer lugar la fase de transición, agregándose en micro-dominios de gel bi-capa. Tras la refrigeración y principalmente tras el calentamiento, los micro-dominios de lípidos bi-capa no restablecen las asociaciones con los restantes componentes de membrana y las regiones resultantes de agregados hexagonales pueden potencialmente desestabilizar la membrana (Quinn, 1989).

La reorganización de los lípidos perturba principalmente las asociaciones normales lípido-lípido y lípido-proteína que son imprescindibles para una función

normal de la membrana (Parks y Graham, 1992). La disposición anormal de los fosfolípidos puede permitir la rápida entrada de moléculas que en situaciones normales atravesarían la membrana lentamente (Amann y Pickett, 1987). Tras la descongelación, la capacidad de fusión y las respuestas de la membrana a las señales de transducción pueden también verse alteradas, lo que conduce a la capacitación precoz y, en consecuencia, a la reducción de la longevidad del semen tras la descongelación (Watson, 1995). La figura 2.1 muestra la estructura de la membrana plasmática del espermatozoide y las alteraciones que sufre por el choque térmico.

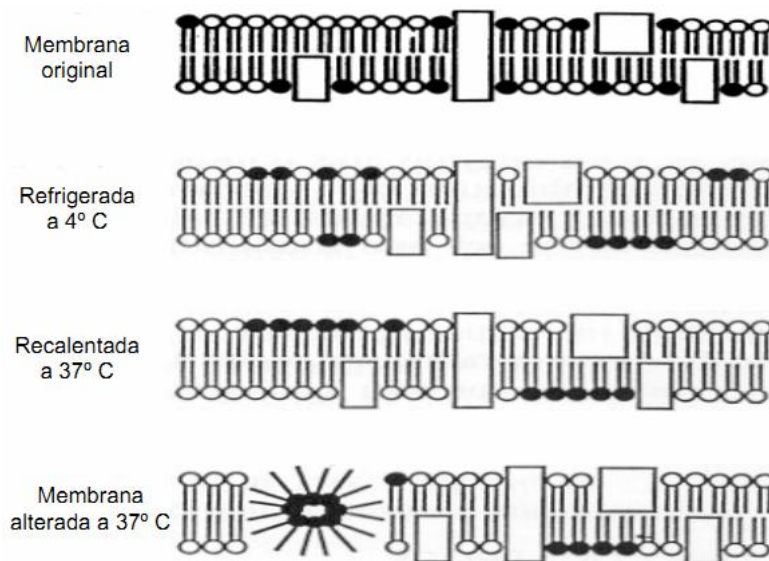


Figura 1 Estructura de la membrana celular del espermatozoide y de las alteraciones inducidas por el choque térmico (Tomado de Serres, 2003).

La susceptibilidad al choque térmico varía con las especies, considerándose los espermatozoides de toro y de cerdo entre los más sensibles donde se manifiesta por marcadas alteraciones en el movimiento de iones, con acumulación de Ca^{2+} y pérdidas de K^{+} y Mg^{2+}

Por el contrario, los espermatozoides del hombre, aves, perro y conejo no evidencian alteraciones tan marcadas (Quinn y White, 1966). Además en los espermatozoides de toro y cerdo se ha detectado acumulación de Na^{+} (De Leeuw y col., 1990).

Algunos constituyentes de la membrana espermática son altamente importantes en el grado de susceptibilidad de los espermatozoides de las distintas especies al choque térmico, esto es, los fosfolípidos y los ácidos grasos (Poulos y col., 1973; Darin-Bennett y col., 1974).

De hecho, espermatozoides de toro, cerdo y morueco, conocidos por su elevada susceptibilidad al choque térmico, presentan una elevada ratio entre ácidos grasos poli-insaturados y saturados de aproximadamente 2,5-3,3, mientras que espermatozoides de conejo y hombre presentan una ratio de 1. Dicha ratio tiene un efecto significativo en algunas propiedades de los sistemas de membrana y está correlacionado con la sensibilidad del espermatozoide al choque térmico (Poulos y col., 1973). Asimismo, comparando la composición de fosfolípidos y de ácidos grasos de la membrana espermática de animales considerados como relativamente resistentes al choque térmico, como es el caso del perro y del gallo, se han observado también algunas diferencias en las proporciones relativas de estos componentes. Sin embargo, la composición en aldehídos y la ratio ácidos grasos poli-insaturados/saturados son semejantes en ambas especies, de proximadamente 1 (Darin-Bennett y col., 1974).

Otro factor también correlacionado con la susceptibilidad del espermatozoide al choque térmico es la ratio colesterol/fosfolípidos, habiéndose observado que una ratio superior a 0,5 confiere una mayor resistencia al choque térmico. Dadas las propiedades del colesterol en la estabilidad e impermeabilidad de la membrana y en el control de la fluidez de las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos, éste proporciona una estructura cohesionada en un determinado rango de temperaturas. El colesterol existente en el espermatozoide de toro y de morueco es la mitad del existente en el espermatozoide del conejo o del hombre (Darin-Bennett y White, 1977). El papel inhibidor del colesterol en la desestabilización del acrosoma quedó probado en el trabajo de Cross (1996), quien identifica al colesterol como el agente del plasma seminal que decapacita los espermatozoides. En el espermatozoide humano se observó durante el choque térmico una pérdida relativamente menor de K⁺, que se consideró como una señal característica de las

lesiones del choque térmico, así como un menor descenso de la motilidad; hecho coexistente con el contenido particularmente elevado en colesterol de su membrana (Drobnis y col., 1993).

En resumen, estos datos sugieren una fuerte relación entre las ratios mencionadas y la reacción al choque, variable según la especie, pese a la heterogeneidad de la membrana del espermatozoide (Darin-Bennett y White, 1977) y a la especialización de las membranas plasmáticas y acrosomales en zonas o dominios (Holt, 1984), lo que dificulta el establecimiento de generalizaciones.

6.2 Alteraciones morfo-funcionales derivadas de la refrigeración

6.2.1 Refrigeración

Los principales daños celulares inducidos por la refrigeración incluyen alteraciones morfológicas como ruptura de la membrana plasmática (principal estructura afectada durante la refrigeración), degeneración acrosomal y lesiones en las mitocondrias (De Leeuw y col., 1990). La pérdida de las propiedades de selectividad en la permeabilidad de la membrana es uno de los hechos que más precozmente se producen en el proceso (Quinn y col., 1980), y que, como hemos visto, está asociada a las fases de transición de los lípidos de la membrana debidas al choque térmico (Watson, 1981a; 1995; Drobnis y col., 1993). Esta pérdida de selectividad puede observarse mediante tinción intra-celular con colorantes incapaces de atravesar la membrana cuando ésta permanece intacta (Medeiros y col., 2002).

En el cerdo, los daños en la membrana plasmática del espermatozoide asociados a la criopreservación están atribuidos a la refrigeración de las células hasta 5°C, más que a los procesos de congelación-descongelación (Maxwell y Johnson, 1997). En el toro, la dilución y refrigeración a 5°C provocan edema del acrosoma en el 50% de los espermatozoides (Jones y Stewart, 1979). La actividad respiratoria del espermatozoide disminuye, así como la glucólisis, lo que provoca una reducción en los niveles de ATP y por ello, la pérdida de la motilidad. Por otra parte, el ADN sufre degeneración. Las alteraciones bioquímicas del

espermatozoide están causadas sobretodo por la pérdida de la selectividad de la membrana y por la pérdida de enzimas y de fosfolípidos (De Leeuw y col., 1990).

La refrigeración anticipa las modificaciones de la membrana plasmática que normalmente se producen durante la capacitación (Watson, 1995); observándose un incremento en la tendencia de las células a mostrar patrones típicos de los estadios de capacitación, cuando son teñidas con colorantes específicos. Estos datos indican que la refrigeración induce un estadio equivalente a la capacitación (Watson, 1996; Green y Watson, 2001); fenómeno también observado a nivel de la reactividad y de la fluidez de la membrana y en las concentraciones celulares de iones, como es el caso del Ca^{2+} , ya aludido (Green y Watson, 2001).

Además, el aumento de Ca^{2+} intracelular durante la refrigeración contribuye a las alteraciones de capacitación y al fenómeno de fusión entre las membranas plasmática y acrosomal externa (Watson, 2000).

Sin embargo, estas alteraciones no reflejan la totalidad de los cambios detectados durante la capacitación in vitro, dando lugar a un estado de capacitación "intermedia". Estos espermatozoides muy probablemente no permanecerían viables el tiempo suficiente para alcanzar el lugar de fecundación y por eso, no proporcionarían porcentajes de fertilidad normales in vivo (principalmente cuando son inseminados en el tracto genital posterior). Por otra parte, podrían sufrir la reacción acrosómica precoz y serían incapaces de fecundar el ovocito (Green y Watson, 2001).

VII. CARACTERÍSTICA DEL SEMEN FRESCO Vs. REFRIGERADO

7.1 Semen fresco vs. Refrigerado

7.1.1. SEMEN FRESCO

Solamente se utiliza la segunda fracción (rica es 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 semen fresco es 60% aproximadamente (Allen, 1992, Esquivel, 2002). Con el semen refrigerado disminuye notablemente este porcentaje y el tamaño de camada es 21.5% más pequeño en perras inseminadas con semen fresco, comparando con perras naturalmente apareadas (Linde-Forsberg y Forsberg, 1989).

7.1.2. 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 de los espermatozoides 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 osmolaridad. 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 cromosoma y una disminución subsecuente en la en la viabilidad del semen (Burgess et al., 2001).

Las tasas de preñez obtenidas utilizando semen refrigerado son de 50-60% (W. Edward, 1992). Según (Linde- Forsberg, 2000) la tasa de parición con este mismo semen es de 45.1% y el tamaño de camada es de 5.8+/-3.0.

VIII.- OBJETIVOS

- Refrigerar semen canino a diez días, utilizando el diluyente CANIPRO™ CHILL 10.
- Conservar la motilidad espermático a lo largo del experimento
- Evaluación del semen, una vez procesado.
- Determinar el porcentaje de efectividad una vez realizada la inseminación artificial.

IX.- HIPÓTESIS

- La Preservación del semen canino con el diluyente CANIPRO™ CHILL 10 tendrá buena motilidad una vez procesado.
- El semen canino refrigerado aun en el decimo día, tendrá un porcentaje aceptable para producir una fecundación.

X. MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio en la Ciudad de Torreón, Coahuila, dentro de las instalaciones del Hospital de Pequeñas Especies de la UAAAN UL; para determinar el porcentaje de motilidad del semen canino refrigerado a diez días con diluyente CANIPRO™ CHILL 10, utilizando aparte yema de huevo para como nutriente auxiliar para la conservación del mismo. Para este trabajo de investigación se ocuparon 5 machos de diferentes; edades, pesos y razas, clínicamente sanos. Se utilizaron hembras tezzzer, para el mejoramiento de la calidad espermática al momento de la colección de la misma.

10.1 Material

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

- Guantes látex
- Vagina Artificial
- Porta objetos
- Microscopio óptico
- Tinción de Diff Quick
- Diluyente CANIPRO™ CHILL 10.

10.2 Evaluación del macho

En los perros se realizó un examen andrológico completo, para así saber si los machos se encontraban en óptimas condiciones para su reproducción (Feldman y Nelson, 1996).

Protocolo para el medio CANIPRO™ CHILL 10 sensación térmica cultivo 10 de semen canino (14574/0105)

La preparación:

Caliente el CANIPRO™ CHILL 10 a temperatura ambiente

La extensión del semen:

- Utilice únicamente la fracción rica en espermatozoides del eyaculado (segunda fracción) para la inseminación. No incluya la primera fracción del eyaculado (fracción prostática claro antes de la fracción

rica en espermatozoides) o la tercera fracción (fracción prostática posterior a la fracción rica en espermatozoides) de la eyaculación en la muestra porque la calidad del semen puede disminuir.

- Después de la recolección evaluar la calidad de semen concentración, motilidad, morfología.
- Diluir una parte del semen en tres a cinco partes de los extensores. (es decir: 1 ml en 3-5 ml de CANIPRO™ CHILL 10) La base sobre la concentración de esperma inicial.

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

CUADRO 1. RELACIÓN DE SEMEN CON EL EXTENSOR CANIPRO™ CHILL 10™ CHILL 10

El semen puede ser conservado durante un máximo de 10 días a 4°C (39 F) con la preservación de un mínimo de 70% de motilidad inicial. Evite cambios de temperatura durante la conservación mediante la colocación de la sonda con el semen mediante un baño María.

- En el momento de la inseminación, caliente el semen a temperatura ambiente y llevar a cabo una evaluación de motilidad.
- Para fines de envío de semen refrigerado- ponga el semen diluido a 4°C (39 F) durante al menos 2 horas antes de empaquetarlo y envío.
- Realizar una evaluación de la motilidad antes del envío y retener una pajilla de control para la evaluación futura.

Se es necesario para alcanzar el volumen ideal de inseminación, añadir un poco de extensión en el tubo de 15 ml en la caja de transporte del semen canino.

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 4 presentaba un menor volumen ($p < 0.05$) que los machos 2 y 3, y una concentración significativamente mayor ($p < 0.05$) que los machos 1 y 5. No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de motilidad y vitalidad cuando se comparaban entre sí los diferentes ejemplares; la motilidad tenía un valor alrededor del 70% (rango individual: 68-73%) mientras que la vitalidad media era superior al 90% (rango individual: 89-95%). El número de morfoanomalías era inferior al 6% en todos los perros.

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

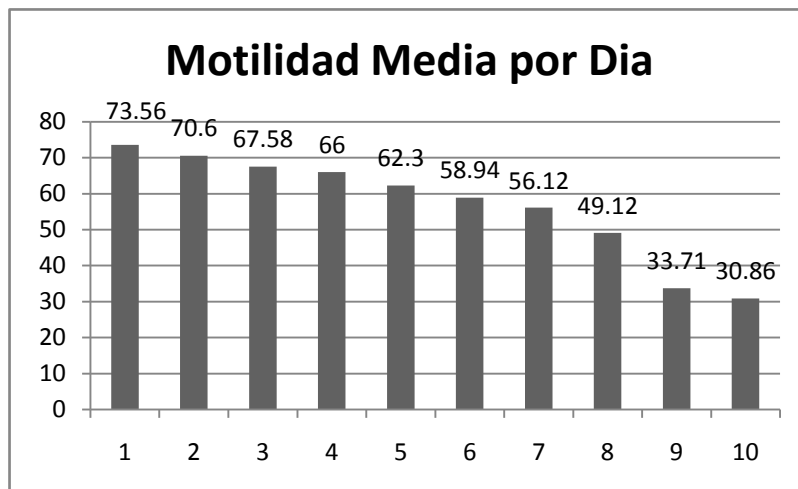
| Perros | Volumen (ml)/ eyaculado | Concentración ($\times 10^6$ células /ml) | Motilidad (%) | Viabilidad (%) | Morfoanomalías (%) |
|--------|-------------------------|--|---------------|----------------|--------------------|
| 1 | 2.0 | 770 | 68.4 | 89 | 3 |
| 2 | 3.0 | 800 | 78.1 | 95 | 4 |
| 3 | 3.5 | 1100 | 74.1 | 90 | 4 |
| 4 | 2.5 | 1300 | 74.7 | 90 | 6 |
| 5 | 2.5 | 700 | 72.5 | 95 | 5 |
| Media | 2.61 | 884.08 | 73.56 | 91.72 | 4.17 |

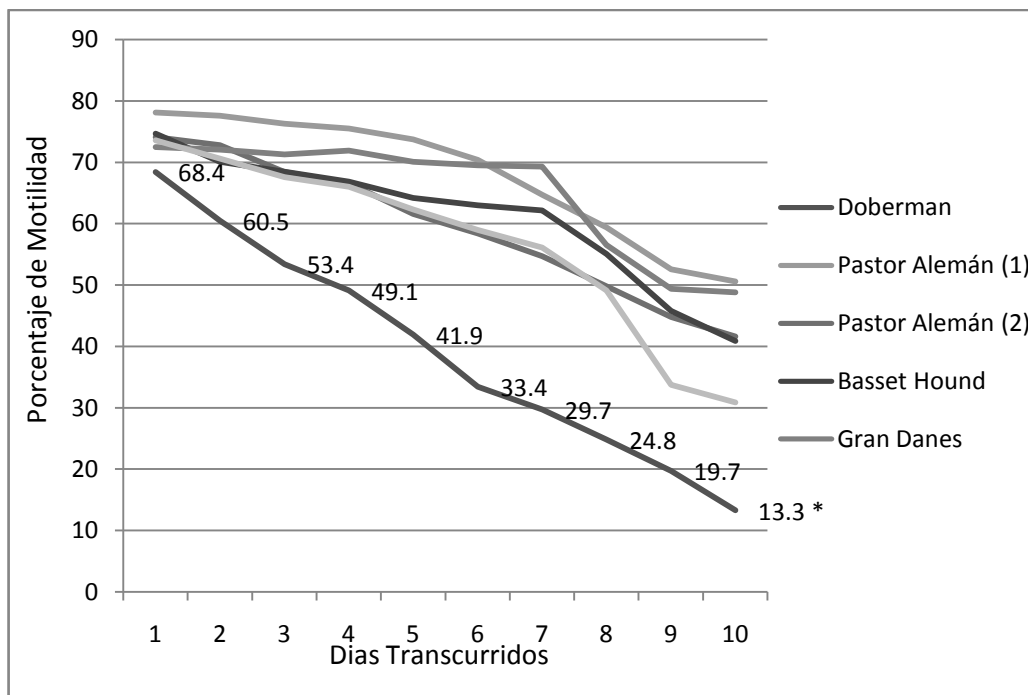
El porcentaje de motilidad (media) obtenido a lo largo del periodo experimental se expresa en la Tabla 2 y Graficas 1 y 2. Con la utilización de CANIPRO™ CHILL 10; la motilidad se situaba alrededor del 60-70% (rango: 73.561%), no existiendo diferencias significativas dentro de cada macho a lo largo de todo el periodo experimental.

| Perros | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h | 120 h | 144 h | 168 h | 192 h | 216 h | 240 h |
|-------------------|-------|------|-------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Doberman | 68.4 | 60.5 | 53.4 | 49.1 | 41.9 | 33.4 | 29.7 | 24.8 | 19.7 | 13.3 |
| Pastor Alemán (1) | 78.1 | 77.6 | 76.3 | 75.5 | 73.7 | 70.4 | 64.7 | 59.4 | 52.6 | 50.6 |
| Pastor Alemán (2) | 74.1 | 72.8 | 68.4 | 66.6 | 61.6 | 58.4 | 54.7 | 49.8 | 44.8 | 41.6 |
| Basset Hound | 74.7 | 70.1 | 68.5 | 66.9 | 64.2 | 63.0 | 62.2 | 55.1 | 45.8 | 40.9 |
| Gran Danes | 72.5 | 72.1 | 71.3 | 71.9 | 70.1 | 69.5 | 69.3 | 56.5 | 49.4 | 48.8 |
| Media | 73.56 | 70.6 | 67.58 | 66.0 | 62.3 | 58.94 | 56.12 | 49.12 | 33.71 | 30.86 |

Tabla 2; Motilidad espermática del semen canino a las 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216 y 240 horas. (%) al inicio y final del experimento.

Grafica 1. Comportamiento diario de la motilidad (Media) a lo largo del periodo experimental.





Grafica 2. Comportamiento Diario de cada donador.

En este grafico lineal se representan la tendencia de descendente en cuanto a la motilidad del semen refrigerado, únicamente señalando el en porcentaje (Concentración de 10x 6/ml). Los valores se reflejan únicamente del donador cuyo semen perdió más motilidad a lo largo del experimento

X. DISCUSIÓN

Este trabajo experimental muestra, en primer lugar, que los resultados obtenidos después de refrigerar y conservar el semen canino con CANIPRO™ CHILL 10, confirman plenamente los resultados obtenidos en estudios realizados por otros autores. Además, los resultados de este estudio demuestran claramente que existen variaciones individuales no significativas en la calidad seminal post-refrigeración.

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

Además, el número de morfoanomalías era inferior al 10%, siendo comparable con los resultados descritos por la mayoría de los autores. Sin embargo, la concentración seminal de nuestros machos (valor medio: 150×10^6 esp/ml) está dentro de los descritos en otros estudios

La motilidad del semen refrigerado con CANIPRO™ Chill 10 oscilaba entre un 60-70% durante el periodo experimental, siendo nuestros resultados comparables a los obtenidos en otros trabajos que utilizan otras técnicas para refrigerar y conservar semen canino. Dentro de cada ejemplar, la motilidad espermática se modificaba muy ligeramente a lo largo del periodo experimental, indicando que este parámetro seminal permanece inalterable durante la refrigeración.

Con respecto a la vitalidad espermática, en la refrigeración, los valores medios de espermatozoides vivos eran prácticamente similares a los de otros autores. En la mayoría de estudios, tras la refrigeración, el porcentaje de vitalidad del semen canino variaba entre 89 y 95%. Estos resultados indican que la variabilidad individual tiene menos influencia sobre el porcentaje de vitalidad post-refrigeración que en el porcentaje de motilidad.

En la mayoría de los estudios, el porcentaje de morfoanomalías alcanza valores entre el 10-25% tras la refrigeración. En nuestro estudio, el porcentaje de morfoanomalías mostraba un valor medio (4.7%).

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

La motilidad progresiva es el parámetro más frecuentemente determinado para la evaluación de la calidad seminal del semen canino refrigerado. 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-refrigeración, y por tanto, ser un parámetro básico para determinar la capacidad fértil del semen canino tras la refrigeración.

Los resultados obtenidos en el estudio confirman que el uso de la técnica de refrigeración utilizando CANIPRO™ Chill 10, para conservar semen canino es de gran utilidad.

XI. CONCLUSIÓN

Ante la necesidad de la conservación de los espermatozoides, interrupción de su metabolismo celular así como de su capacidad de fertilidad, se utilizan métodos de refrigeración o congelación, utilizando temperaturas reducidas que depriman el metabolismo. La refrigeración permite mantener la longevidad y la capacidad fecundante de los espermatozoides por algunas días, produciendo que su metabolismo sea completamente abolido, obteniendo pocos daños en sus membranas gracias a la utilización de los adecuados diluyentes. Teniendo en cuenta que los cinco perros utilizados en el experimento, respondieron satisfactoriamente al método de refrigeración de semen, gracias a la eficiente planeación que es clave para tener éxito en cualquier programa de cría. Esto es muy importante cuando se trata de semen refrigerado. Ahora que nosotros realizamos tanto colectas de semen como preparación de un producto de buena calidad de semen refrigerado, pensamos en la perra reproductora.

En situaciones donde tenemos una cantidad muy limitada de semen, o no tenemos un número muy grande de dosis para inseminar, es muy importante planear una cría con una perra probada. Es mejor una perra que ha sido buena reproductora en el pasado. Lo que quiero decir; es que tenga ciclos estrales normales, concibe sin dificultad, y llega al término de la gestación sin complicaciones.

Todas las perras, primerizas o no, debe examinarse para: *Brucella canis* y *Mycoplasma*. Estas infecciones se transmiten durante el apareamiento y el contacto casual podría transmitir estas enfermedades de un animal a otro sin reproducirse. Considero que viendo las tablas y graficas anexadas, que a pesar de tener unos perros con las mismas características de peso, talla, y condiciones optimas de reproducción, dejo mucho que desear el primer donante, ya que el desempeño del semen, vario en gran proporción en comparación con los demás, provocando una variable en las medias y resultados; pero aun así teniendo posibilidad de utilizar el semen para la IA, y obteniendo un 80% de efectividad en diagnostico de gestación post inseminación.

LITERATURA CITADA

1. ABUSINEINA, M.E.: A study of the fern-like crystalline patterns of the cervical and vaginal mucus of cattle. Vet. Rec., 74: 619-621 (1962).
2. ALLEN, E. 1992 Fertility and obstetrics in the dog. Oxford (England): Blackwell Scientific publications limited. p. 1-175.
3. AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. (1987) - Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Science* 7: 145-176.
4. BIELFELD, P.; JEYENDRAN, R.S.; HOLMGREN, W.J.; ZANEVELD, L.J.D (1990) - Effect of egg yolk medium on the acrosome reaction of human spermatozoa. *J Androl* 11: 260-269.
5. BLACKSHAW, A.W. (1954) - The prevention of temperature shock of bull and ram semen. *Aust Journ of Biol Sci* 7: 573-582.
6. BROWN, R. M. 1992 An update of artificial insemination with fresh, chilled, and frozen semen. *Probl vet med.* 4(3):p. 445-52.
7. CONCANNON P.W., England G., Verstegen J. and Linde-Forsbers. 2001. Uso de kits comerciales para ensayos de hormona luteinizante y de progesterona en el manejo reproductivo canino
8. DARIN-BENNETT, A.; POULOS, A.; WHITE, I.G. (1974) - The phospholipids and phospholipid bound fatty acids and aldehydes of dog and fowl spermatozoa. *J Reprod Fert* 41: 471-474. }
9. DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I.G. (1977) - Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology* 14: 466-470.
10. DAVOL, P. A. 2000. Canine Reproduction. Part 1: Reproduction and the male dog. <http://www.labbies.com/reproduction4.htm>. (consulta : 10 de agosto 2004).
11. DE LEEUW, F.E.; COLENBRANDER, B.; VERKLEIJ, A.J. (1990) - The role membrane plays in cold shock and freezing injury. *Reprod Dom Anim Suppl* 1: 95-104.

12. DESACHY, F ; 2000, La reproducción del perro; primer edición; editorial Vecchi.
13. DROBNIS, E.Z.; CROWE, L.M.; BERGER, T.; ANCHORDOGUY, T.J.; OVERSTREET, J.W.; CROWE, J.H. (1993) - Cold shock damage is due to lipid phase transicions in cell membranes: a demosntration using sperm as a model. *The Journal Exp Zool* 265: 432-437.
14. ESQUIVEL ,L. C. 2002 Reproducción en pequeñas especies. Memoria de la XII de ciencia Animal ; 2002 28 Octubre- 2 de Noviembre; Torreón Coahuila. México. Formato electrónico.
15. EDWARD C, Feldman , Richard w, Nelson; 2000 ; Endocrinología y reproducción en perros y gatos; segunda edición, editorial McGraw- Hill interamericana.
16. FARSTAD, W. 2000. Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology*, 53 (1) : p.175-86.
17. FOOTE, R.H.; ARRIOLA, J. (1987) - Motility and fertility of bull sperm frozen-thawed differently in egg yolk and milk extenders containing detergent. *J Dairy Sci* 70: 2642-2647.
18. FOSTER, R. Y M. Smith. 2001. Artificial Isemination (AI). petEducation. <http://www.peteducation.com/repro/AI.htm>.
19. FOULKES, J.A. (1977) - The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. *J Reprod Fert*49: 277-284.
20. GREEN, C.E.; WATSON, P.F. (2001) - Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction* 122: 889-898.
21. GUNZEL, A. R. 1986. Sperm collection, evaluation, preservation and artificial isemination in the dog. *Tierarztl prax*, 14(2):p.275-82.
22. HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P. (1990) - Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl* 11: 73-88.

23. HEAPE, W. 1897. Artificial insemination of mammals and the subsequent fertilisation or impregnation of their ova. Proc Royal Soc. London: 61: 52-56
24. HOLT, W.V. (2000) - Basic aspects of frozen storage of semen. Anim Reprod Sci 62: 3-22.
25. HUTCHISON, R. V. 2001. Canine Reproduction for Breeders, Seminar. Company at the 2001 Westminster kennel club show.
26. JHONSTON, D. J., M.V.R. Kuztritz y P. Olso. 2001. Canine and feline theriogenology. Philadelphia (United State) : Ed. Saunders. 16:287-306.
27. JONES, R.C.; STEWART, D.L. (1979) - The effects of cooling to 5°C and freezing and thawing on the ultrastructure of bull spermatozoa. J Reprod Fertil 56: 233-238.
28. KAMPSCHMIDT, R.F.; MAYER, D.T.; HERMAN, H.A. (1953) - Lipid and lipoprotein constituents of egg yolk in the resistance and storage of bull spermatozoa. J Dairy Sci 36: 733-742.
29. MANJUNATH, P.; NAUC, V.; BERGERON, A.; MÉNARD, M. (2002) - Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. Biol Reprod 67: 1250-1258.
30. MAXWELL, W.M.C.; JOHNSON, L.A. (1997) - Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. Therio 48: 209-219.
31. MAYBEMOM; TEST DE SALIVA. Consulta de internet.
http://www.maybemom.com/es/how_works
32. MC DONALD, 1975. Veterinary Endocrinology and reproduction. 2nd Ed. Lea and Febiger.
33. MEDEIROS, C.M.O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A.T.D.; RODRIGUES, J.L. (2002) - Current status of cryopreservation: why isn't it better? Therio 57: 327-344.
34. MORTON, D.B. 1986. Review on the use of frozen semen in dog breeding. Animal Technology, 37(1):p.67-71.
35. NURIA DE BUEN DE ARGUERO . 2001. Citología diagnóstica veterinaria, Editorial Manual moderno.

36. PACE, M.M.; GRAHAM, E.F. (1974) - Components in egg yolk wich protect bovine spermatozoa during freezing. J Anim Sci 39: 1144-1149.
37. PARKS, J.E. & GRAHAM, J.K.(1992) - Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. Therio 38: 209-222.
38. PHILLIPS, P.H.; LARDY, H.A. (1940) - A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen. J Dairy Science 23: 399-404.
39. PERÉZ, O. A. 2001 . Historia Veterinaria: Verdades y mitos sobre lo que han hecho los veterinarios. <http://www.visionveterinaria.com/historia/04dic2001.htm>.
40. POULOS, A.; DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I.G. (1973) - The phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of mammalian spermatozoa. Comp Biochem Physiol 46B: 541-549.
41. PURSWELL, B. J. Y N. A. PARKER 2000. Modern breeding management in dogs. Veterinary Medicine. <http://www.hilltopanimalhospital.com/moder%20breeding%20management.htm>.
42. QUINN, P.J.; WHITE, I.G. (1966) - The effect of cold shock and deep-freezing on the concentration of major cations in spermatozoa. J Reprod Fertil 12: 263-270.
43. QUINN, P.J.; CHOW, P.Y.W.; WHITE, I.G. (1980) - Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. J Reprod Fertil 60: 403-407.
44. RUCKEBUSCH, Y., L. P. Phaneuf y R. Dunlop. 1991. Fisiología de pequeñas y grandes especies. México, D.F. El manual Moderno, S.A. de C.V. P.609-16.
45. SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. (1995) - Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. Anim Reprod Sci 38: 1-36.
46. SANCHEZ, A. 1998. INSEMINACION ARTIFICIAL EN PERROS. IV Curso internacional de medicina y cirugía en pequeños animales. MEVEPA V Region- Universidad de Chile. Concon, Chile, pp.122-131.

47. SÁNCHEZ, A. 2000. Examen clínico reproductivo en la perra doméstica, Curso Tópicos en reproducción de pequeños animales . Universidad de Chile. Santiago, Chile, pp. 60-66.
48. SHANNON, P; CURSON, B. (1983a) - Effect of egg yolk levels on the fertility of diluted bovine sperm stored at ambient temperatures. *New Zea J Agr Res* 26: 187-189.
49. SISSON, S., J. D. Grossman y R. Getty. 1993. Anatomía de los animales domésticos. 5 Ed. Tomo II, México: Salvat. P. 1728-41.
50. 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.1728-41.
51. VEGA GORDO, L; Matas parra, C., 1998 Tecnología de la inseminación artificial en caninos.
52. VILLALBA, G. A. 1997 La inseminación artificial. *Infomascota*.
<http://www.infomascota.com>
53. VISHWANATH, R.; SHANNON, P.; CURSON, B. (1992) - Cationic extracts of egg yolk and their effects on motility, survival and fertilising ability of bull sperm. *Anim Reprod Sci* 29: 185-194.
54. WATSON, P.F. (1981a) - The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: *Effects of Low Temperatures on Biological Membranes*. G.J.Morris & A.Clark, eds. Academic Press, New York, pp189-218
55. WATSON, P.F. (1995) - Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fert Dev* 7: 871-891
56. WATSON, P.F. (1996) - Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. *Reprod Dom Anim* 31: 135-140
57. WATSON, P.F. (2000) - The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 60-61: 481-492.
58. WHITE, I.G. (1993) - Lipids and calcium uptake of sperm in relation to coldshock and preservation: a review. *Reprod Fert Dev* 5: 639-658.