

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**COLECCIÓN, EVALUACIÓN Y PRESERVACIÓN
DEL SEMEN CANINO**

POR

GILBERTO LINARES RAMÍREZ

MONOGRAFÍA

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

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAHUILA

JUNIO 2002

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**COLECCIÓN, EVALUACIÓN Y PRESERVACIÓN
DEL SEMEN CANINO**

MONOGRAFÍA

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

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

GILBERTO LINARES RAMÍREZ

ASESOR:

MVZ JOSÉ LUIS FRANCISCO SANDOVAL ELÍAS

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

**COLECCIÓN, EVALUACIÓN Y PRESERVACIÓN
DEL SEMEN CANINO**

MONOGRAFÍA

APROBADO POR EL COMITÉ DE MONOGRAFÍA

PRESIDENTE DEL JURADO



MVZ JOSÉ LUIS FRANCISCO SANDOVAL ELIAS

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



MVZ ERNESTO MARTÍNEZ ARANDA



Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal
UAAAN - UL

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**


UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

**COLECCIÓN, EVALUACIÓN Y PRESERVACIÓN
DEL SEMEN CANINO**




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



M.V.Z. CARLOS RAÚL RASCÓN DÍAZ
VOCAL



M.V.Z. ERNESTO MARTÍNEZ ARANDA
VOCAL



M.V.Z. E.P. MA. HORTENSIA CEPEDA ELIZALDE
VOCAL SUPLENTE

Agradecimientos:

A Dios por darme el don de la existencia y la sabiduría.

A mi Alma Terra Mater por su abrigo en mi estancia a lo largo de la carrera.

A mis padres Salvador y Marina por haberme formado en un hogar lleno de dicha y amor, y por su apoyo incondicional en mi formación académica.

A mis hermanos Gustavo, Elizabeth y Eréndira, por haber compartido el que para mí es el mejor de los hogares.

A mi amada Eva por estar a mi lado en tantos momentos felices y desvelos.

A mis suegros y cuñados por todo su apoyo brindado durante toda mi estancia en esta ciudad.

A mi papá Roque, a mi mamá Daría, a mi mamá Micaela y a mi papá Onésimo por haberme dado unos padres tan maravillosos.

A todos mis amigos que no menciono por no cometer el error de omitir a alguno de ellos.

A mis asesores MVZ Francisco Sandoval y MVZ Carlos Razcón por su apoyo en la realización de este trabajo

A la MVZ EP Hortensia Cepeda por haber mostrado siempre un gran interés en este trabajo.

A Luis Hernández por su tiempo y colaboración brindados para el buen término de esta monografía.

Y a todos los profesores por haberme brindado su conocimiento.

A todos muchas gracias.

Dedicatoria:

A mi pequeña Marina por ser la luz que ilumina mi sendero y por ser mi más grande motivo de superación.

A la memoria de mi papá Onésimo por toda su paciencia, enseñanza y por todas las tardes amenas que compartió conmigo, que Dios lo tenga en su Santa Gloria.

Y del que fuera mi amigo y más fiel compañero, y a todas las criaturas del Señor, que han inspirado en mi tan noble profesión.

INDICE:

| | |
|---|----|
| INTRODUCCIÓN. | 1 |
| I. ANATOMÍA DEL APARATO REPRODUCTOR DEL PERRO. | 3 |
| 1.1. Escroto. | 3 |
| 1.2. Testículos. | 3 |
| 1.3. Epidídimo. | 3 |
| 1.4. Cordón Espermático. | 4 |
| 1.5. Conducto Deferente. | 4 |
| 1.6. Glándula Prostática. | 5 |
| 1.7. Pene. | 5 |
| 1.8. Prepucio. | 5 |
| 1.9. Uretra. | 6 |
| 1.10. Canal Inguinal. | 6 |
| II. ENDOCRINOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN. | 7 |
| 2.1. Hormonas Hipotalámicas. | 7 |
| 2.1.1. Hormona Liberadora de Gonadotropina [GnRH]. | 7 |
| 2.2. Hormonas Hipofisarias. | 7 |
| 2.2.1. Hormona Folículo estimulante [FSH]. | 7 |
| 2.2.2 Hormona Estimulante de las Células Intersticiales [ICSH]. | 8 |
| 2.4. Hormonas Testiculares o Andrógenos. | 9 |
| 2.4.1. Testosterona. | 10 |
| 2.4.2. Dihidrotestosterona. | 10 |
| 2.4.3. Inhibina. | 11 |
| III. FISIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN. | 11 |
| 3.1. Espermatogénesis. | 11 |
| 3.2. Control de la Temperatura. | 12 |
| 3.3. Transporte del esperma. | 13 |
| 3.4. Próstata. | 14 |
| 3.5. Erección. | 14 |

| | |
|---|----|
| 3.6. Producción de Esperma en el semental. | 16 |
| 3.7. Eyaculación. | 16 |
| 3.7.1. Primera Fracción. | 16 |
| 3.7.2. Segunda Fracción. | 17 |
| 3.7.3. Tercera Fracción. | 17 |
| IV. EVALUACIÓN DEL SEMENTAL. | 18 |
| 4.1. Examen Clínico General. | 18 |
| 4.1.1. Historia Clínica. | 19 |
| 4.1.2. Examen Físico. | 19 |
| 4.1.3. Examen Clínico. | 23 |
| 4.1.4. Valoración de la Líbido. | 25 |
| V. COLECCIÓN DEL SEMEN. | 25 |
| 5.1. Requisitos para la Colección. | 26 |
| 5.1.1. Hembra Celadora [Teaser]. | 26 |
| 5.1.2. Feromonas. | 26 |
| 5.1.3. Lugar. | 27 |
| 5.1.4. Preparación del Equipo. | 28 |
| 5.2. Equipo Necesario. | 28 |
| 5.3. Métodos de Colección del Semen | 30 |
| 5.3.1. Manual. | 30 |
| 5.3.1.1. Preámbulo. | 30 |
| 5.3.1.2. Técnica. | 31 |
| 5.3.2. Cono Artificial. | 36 |
| 5.3.3. Vagina Artificial. | 36 |
| 5.3.4. Electroeyaculación. | 37 |
| 5.4. Fracasos en la Colección. | 37 |
| VI. EVALUACIÓN DEL SEMEN. | 38 |
| 6.1. Manejo del Semen. | 38 |
| 6.2. Razones para la Evaluación. | 39 |
| 6.3. Limitaciones de la Evaluación. | 39 |

| | |
|--|----|
| 6.4. Evaluación de la Muestra. | 40 |
| 6.4.1. Evaluación Macroscópica. | 40 |
| 6.4.1.1. Volumen. | 41 |
| 6.4.1.2 Color. | 41 |
| 6.4.1.3. Olor. | 42 |
| 6.4.1.4. pH. | 42 |
| 6.4.2. Evaluación Microscópica. | 43 |
| 6.4.2.1. Motilidad. | 44 |
| 6.4.2.2. Concentración. | 46 |
| 6.4.2.3. Porcentaje Vivo. | 48 |
| 6.4.2.4. Morfología. | 48 |
| 6.4.2.5. Presencia de Otras Células. | 53 |
| 6.4.2.6. Microbiología. | 54 |
| VII. PRESERVACIÓN DE SEMEN. | 56 |
| 7.1. Efecto de la Preservación del Semen Canino a Bajas Temperaturas. | 56 |
| 7.2. Adición de Extensores. | 58 |
| 7.2.1. Protectores de Frío y Crioprotectores. | 58 |
| 7.3. Semen Fresco. | 59 |
| 7.4. Semen Refrigerado. | 59 |
| 7.4.1. Extensores para Semen Refrigerado. | 59 |
| 7.4.2. Preparación de Semen. | 61 |
| 7.4.3. Material de Empaquetado de Semen Refrigerado. | 63 |
| 7.4.4. Vitalidad <i>In Utero</i> . | 64 |
| 7.4.5. Resultados del Uso de Semen Refrigerado. | 64 |
| 7.5. Semen Congelado. | 64 |
| 7.5.1. Extensores para semen congelado. | 66 |
| 7.5.2. Preparación de Semen congelado. | 67 |
| 7.5.3. Procedimiento Básico de Congelación. | 67 |
| 7.5.4. Procedimiento de Congelación de Uppsala. | 68 |
| 7.5.5. Descongelado de las Pajillas. | 69 |
| 7.5.6. Envío de Semen congelado. | 70 |

| | |
|--|-----------|
| 7.5.7. Vitalidad <i>In Utero</i> . | 71 |
| 7.5.8. Resultados del uso de Semen congelado. | 72 |
| 7.6. Identificación de Frascos o Pajillas de Semen. | 73 |
| REFERENCIAS. | 74 |

INTRODUCCIÓN.

El desarrollo de la tecnología de asistencia reproductiva en caninos comenzó en el siglo XVIII (Farstad, 2000), pues ya en 1776 el fisiólogo italiano Lázaro Spallanzani había observado que las bajas temperaturas provocaban una reducción reversible de la actividad metabólica de los espermatozoides, lo cual permitía almacenarlos; posteriormente en 1787 hace el primer informe sobre el uso de inseminación artificial en animales domésticos, donde pudo obtener tres cachorros después de inseminar una perra con semen fresco; este procedimiento ha sido aplicado y desarrollado a través del tiempo en la reproducción de pequeños animales (Farstad, 2000; Stornelli *et al.*, 2001a).

Para el siglo XIX en el año de 1827 Karl Ernest von Baer hace la primera descripción verdadera de un óvulo mamífero tomado de una perra (Farstad, 2000).

Más recientemente en 1956 Harrop logra la primer preñez con semen refrigerado abriendo las puertas a la criopreservación, que reporto junto con la primera descripción de la fisiología reproductiva canina, preservación a corto plazo de semen canino y desarrollo de las técnicas para inseminación artificial, y en 1969 Stephen Seager informa por primera vez una inseminación artificial satisfactoria en perras usando semen canino congelado (Farstad, 2000; Stornelli *et al.*, 2001a).

Con estos antecedentes podemos observar que el progreso en esta área se ha desarrollado lentamente, comenzando un avance progresivo en 1970 con un perfeccionamiento de las técnicas de preservación y del equipo de inseminación en el campo de reproducción canina, alcanzando grandes avances realizados en la colección y preservación de semen refrigerado en los últimos años (Farstad, 2000; Greenbank *et al* 2000); haciéndolo relativamente nuevo en medicina canina, sin embargo, ha sido practicado con éxito en ganado y otras

especies durante muchas décadas y aunque descansamos en los hombros de la investigación y experiencia desarrollados en la práctica bovina aún no se ha logrado reproducir su proporción de éxito (Foster *et al.*, 2001).

También fue necesario desarrollar técnicas de colección y evaluación de semen, además de una evaluación completa del semental para la preservación del semen canino (England *et al.*, 2000; Esquivel *et al.*, 2001).

Gracias al reconocimiento del American Kennel Club de camadas concebidas de semen congelado en 1981 y la aceptación subsecuente de semen refrigerado (Hutchison, 1999), permitiendo que la tecnología de congelación de semen canino este disponible en USA desde entonces (Greenbank *et al* 2000) y actualmente el interés en el envío internacional de semen canino refrigerado o congelado está aumentando considerablemente tanto como en el número de medios del almacenamiento (Linde, 2001; Stornelli *et al.*, 2001a).

Por otro lado, en México existe escasa o nula información científica en el área de la reproducción canina con semen preservado, pues no se encontraron reportes de su utilización. No obstante gracias a que la reproducción canina es una afición de distribución mundial, para los médicos veterinarios y criadores, el conocimiento de preservación del semen canino y sus técnicas de inseminación artificial están alcanzando un alto grado de interés.

Es por eso que el presente trabajo, es una revisión sobre la colección, evaluación y preservación del semen canino y pretende contribuir con el conocimiento de estas tecnologías de asistencia reproductiva y su aplicación futura en nuestro país.

I. ANATOMÍA DEL APARATO REPRODUCTOR DEL PERRO.

1.1. Escroto.

Adams (1988) lo define como un saco de piel que contiene a los testículos. Está situado cerca de la mitad que existe entre la región inguinal y el ano y es dividido por un septum medio en dos cavidades, ocupadas cada una por los testículos, epidídimo y parte distal del cordón espermático. La piel es delgada y pigmentada muy escasamente cubierta de pelos muy finos. El rafe no es muy visible (Sisson *et al.*, 1993).

1.2. Testículos.

Los testículos atraviesan el canal inguinal aproximadamente a los 10 a 15 días del nacimiento (Adams, 1988), aunque Allen (1992) dice que a los 4 días, alcanzando su ubicación en el escroto a los 35 días. Son relativamente pequeños y tienen forma oval o redondeada. El mediastino testicular da origen a un tabique de tejido conectivo que divide los testículos en lóbulos incompletos que contienen los tubos seminíferos. Los tubos se vacían en la *rete testis* del mediastino. Esta drena en los conductos deferentes que se unen para formar la cabeza del epidídimo (Sisson *et al.*, 1993; Esquivel *et al.*, 2001).

Las dos funciones principales del testículo, son la exocrina o producción de espermatozoides y la endocrina o producción de hormonas masculinas (Esquivel *et al.*, 2001).

1.3. Epidídimo.

El epidídimo es largo, extremadamente enrollado sobre sí mismo (Allen, 1992; Sisson *et al.* 1993) para formar una estructura que puede describirse como

formada por cabeza, cuerpo y cola (Allen, 1992). Está íntimamente unido a lo largo de la parte dorsal de la superficie lateral del testículo (Sisson *et al.*, 1993).

1.4. Cordón Espermático.

El cordón espermático (*Funiculus spermaticus*) es un manojo de varios tejidos que va entre el testículo y la pared abdominal (Allen, 1992), comienza en el anillo inguinal profundo, donde sus partes constituyentes se juntan, se extiende oblicua y ventralmente a través del canal inguinal pasa junto al pene para terminar en el borde de inserción del testículo. Está formado según Sisson *et al.* (1993) por las siguientes estructuras:

1. Arteria testicular
2. Venas testiculares, que forman el plexo pampiniforme alrededor de la arteria.
3. Linfáticos que acompañan a las venas
4. Plexo testicular de nervios autónomos, que van junto a la arteria.
5. Conductos deferentes, arteria y vena.
6. Haces de tejido muscular liso alrededor de los vasos [antes considerado como músculo cremáster interno].
7. Capa visceral de la túnica vaginal. El cordón espermático y la túnica vaginal son largos, cruzan el lado del pene muy oblicuamente. El extremo más superior de la túnica está algunas veces cerrado, de modo que no existe anillo vaginal.

1.5. Conducto Deferente.

Los conductos deferentes tienen un diámetro de 1mm aproximadamente y son rígidos, constituyen una buena orientación para la localización de testículos abdominales durante intervención quirúrgica (Allen, 1992), son la continuación

de la cola del epidídimo, con una ampolla estrecha. Entran a la superficie craneodorsal de la próstata (Sisson *et al.*, 1993).

1.6. Glándula Prostática.

La próstata es la única glándula genital accesoria en el perro (Adams, 1988; Allen, 1992; Esquivel *et al.*, 2001) es relativamente grande, de color amarillento y con una estructura densa; se localiza a la altura del borde craneal del pubis o cerca de él. Es globular y rodea el cuello de la vejiga y la uretra durante su unión. Existe un surco medio que indica una división en dos lóbulos laterales. La glándula esta sujeta a muchas variaciones en tamaño y a menudo está alargada, especialmente en los animales viejos (Sisson *et al.*, 1993).

1.7. Pene.

El pene esta compuesto por de raíz, cuerpo y glande, presenta varios hechos notables. En su parte caudal existen dos cuerpos cavernosos de carácter venoso, separados por un tabique medio. 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; caudalmente existe alargamiento redondeado llamado bulbo del glande. Ambos están compuestos por tejido eréctil. Un pequeño músculo [isquiouretral] surge de la tuberosidad isquiática de ambos lados; los dos convergen en el dorso cerca del bulbo del glande y comprimen las venas dorsales y pueden tender a elevar el pene y, por tanto, intervienen en la copulación (Sisson *et al.*, 1993; Esquivel *et al.*, 2001).

1.8. Prepucio.

El prepucio es un estuche modificado de piel (Adams, 1988) cubre completamente el pene no erecto (Allen, 1992) que forma una vaina completa alrededor de la parte craneal. La capa más externa es ordinariamente

integumento. Las capas internas son delgadas, de color rojizo y aglandulares. La capa peneal está muy unida a la *pars longa* del glande, y menos al bulbo del glande. En estas capas hay muchos nódulos linfáticos, que son especialmente grandes y a menudo prominentes en el fondo de la cavidad prepucial (Sisson *et al.*, 1993).

1.9. Uretra.

Su función es transportar tanto la orina como el semen hasta el extremo del pene (Allen, 1992). La parte pelviana de la uretra es relativamente grande. Su primera porción se extiende desde la vejiga y esta cubierta por la próstata. En el arco isquial existe un bulbo del pene bien desarrollado. Está dividido por un surco medio y un tabique en dos lóbulos laterales o hemisferios y cubierto por un músculo corto pero fuerte, llamado músculo bulbocavernoso. El músculo uretral es muy fuerte, circunda la uretra desde la próstata, caudalmente, y tiene un rafe medio dorsal. El músculo isquiouretral surge de la tuberosidad isquiática y termina por un anillo fibroso en la sínfisis isquiática, a la que rodean las venas dorsales del pene (Sisson *et al.*, 1993).

1.10. Canal Inguinal.

Es un espacio estrecho en los músculos de la pared abdominal que sirve de entrada a los vasos espermáticos y el conducto deferente. En ocasiones este canal tiene la anchura suficiente para permitir el paso de parte del contenido abdominal formando de esta manera una hernia inguinal; esto puede suceder también en la hembra (Allen, 1992).

II. ENDOCRINOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN.

El desarrollo del sistema reproductor está bajo control genético (Cunningham, 1999). Todos los embriones de mamíferos están programados para ser hembras, sin embargo, la presencia de un solo gen en el cromosoma Y, inducirá el desarrollo de los testículos. Este desarrollo es una parte crítica de diferenciación masculina porque este órgano secretará dos sustancias requeridas para el desarrollo normal del tracto reproductor masculino: sustancia muleriana inhibidora [MIS, mullerian inhibiting substance], que ocasiona la regresión de los conductos de Muller que desarrollarían los órganos reproductores femeninos; y testosterona, la hormona masculina que estimulará los conductos de Wolf o mesonefros para desarrollar los órganos masculinos de reproducción (Cunningham, 1999; Davol, 2001).

2.1. Hormonas Hipotalámicas.

2.1.1. Hormona Liberadora de Gonadotropina [GnRH].

Se produce en el hipotálamo [en la base del encéfalo] y es transportada hasta la hipófisis anterior mediante un sistema especializado de vasos sanguíneos. Determina de forma selectiva la liberación de la hormona folículo estimulante [FSH] y de la hormona estimulante de las células intersticiales [ICSH] en la hipófisis anterior (Allen, 1992; England *et al.*, 2000).

2.2. Hormonas Hipofisiarias.

2.2.1. Hormona Folículo estimulante [FSH].

Es producida en la adenohipófisis por las células Delta, es una glucoproteína, tiene como tejido blanco al epitelio germinal de los tubos seminíferos en el macho (García, 1988), es responsable de la determinación de algunos procesos

en la espermatogénesis (García, 1988; Allen,1992; England *et al.*, 2000), estimulando a las células de Sertoli a la producción de andrógenos y secreción de estrógenos a través de la conversión intracelular de testosterona (Fayrer, 1996). Las células de Sertoli son adyacentes a la espermatogonia dentro de los tubos seminíferos (England *et al.*, 2000).

Los niveles de FSH también son un indicador de la función testicular. Si los niveles permanecen excesivamente altos [5 a10 veces del límite base normal] entonces hay células de Sertoli dañadas significativamente. Las células de Sertoli normalmente secretarían inhibina que retroalimentan negativamente en FSH. Entonces en la ausencia de inhibina los niveles de FSH se elevarían extremadamente (Fayrer, 1996).

Las concentraciones en suero, fluctúan notablemente durante el día (England *et al.*, 2000).

2.2.2 Hormona Estimulante de las Células Intersticiales [ICSH].

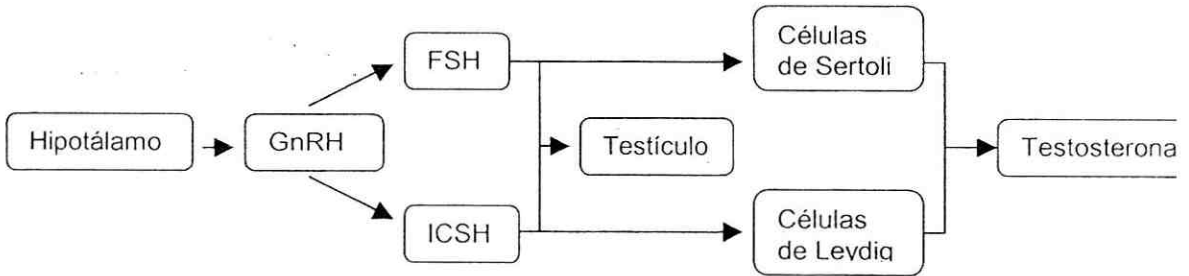
También denominada hormona luteinizante en las hembras [LH] es una glucoproteína producida en las células Delta de la adenohipófisis al igual que la FSH, es responsable de la estimulación de las células intersticiales [células de Leydig] en el testículo para acelerar la síntesis y secreción de testosterona (García, 1988; Fayrer, 1996) y dihidrotestosterona (Allen,1992; England *et al.*, 2000) además de ser muy importante para que el macho desarrolle su actividad sexual (García, 1988) pero interesantemente, también producen estrógenos en cantidades sustanciales para aromatizar a los andrógenos (England *et al.*, 2000).

No han sido bien determinadas sus concentraciones normales en el perro (Allen,1992), pero al igual que la FSH sus concentraciones séricas varían durante el día (England *et al.*, 2000).

2.4. Hormonas Testiculares o Andr6genos.

La funci3n del test6culo est1 regulada de manera que pueda mantener en forma constante la producci3n de espermatozoides, raz3n por la cual la aplicaci3n ex3gena de hormonas, especialmente la de testosterona, alterar1 su funcionamiento, seg6n Esquivel *et al.* (2001) el test6culo depende para su funcionamiento b1sicamente de:

Control General:



Control Local: Se refiere a la comunicaci3n que existe entre el tubo semin6fero y las c1elulas de Sertoli y germinales, que contienen el tejido intersticial que rodea los tubos y sus componentes [vasos sangu6neos, vasos linf1ticos y c1elulas de Leydig].

Los andr3genos son del grupo de los esteroides (Garc6a, 1988), se producen en los test6culos por las c1elulas intersticiales [c1elulas de Leydig], que forman peque1os islotes entre los tubos semin6feros; estimulan el desarrollo de las caracter6sticas masculinas, ponen en marcha la actividad sexual e influyen en el desarrollo de la gl1ndula prost1tica (Garc6a, 1988; Allen, 1992).

Los test6culos ect3picos [por ejemplo en los cript3rquidos] siguen produciendo andr3genos (Allen, 1992).

2.4.1. Testosterona.

La testosterona es la principal hormona testicular, su síntesis se realiza a través del acetato y el colesterol (García, 1988).

Los efectos de la testosterona incluyen la inducción de otras características físicas del género así como los rasgos de conducta incluyendo la libido y delimitación territorial con orina (Fayrer, 1996; Davol, 2001). La testosterona pasa a los tubos seminíferos donde es esencial para el mantenimiento de la espermatogénesis, en particular, el inicio de la meiosis (Fayrer, 1996).

En los perros adultos las concentraciones de testosterona en plasma varían entre 0.5 y 5.0 ng/ml (Allen, 1992). En suero pueden ser de 0.4 a 10 ng/ml, pero generalmente entre 1 y 4 ng/ml es aceptable (Fayrer, 1996).

Existe gran variación individual durante el día, por lo que el análisis de una muestra única tiene poco valor. En perros castrados, los valores de testosterona son siempre inferiores a 200 pg/ml (Allen, 1992).

La testosterona junto con los estrógenos ejercen un efecto de retroalimentación negativa [feedback] sobre FSH y LH (England *et al.*, 2000).

2.4.2. Dihidrotestosterona.

La conversión intracelular de testosterona a dihidrotestosterona por medio de la enzima 5 alpha-reductasa, para que ocurra la masculinización de los tejidos (Cunningham, 1999) como el desarrollo de la glándula prostática, la uretra masculina, el pene, y el escroto (Daval, 2001).

2.4.3. Inhibina.

Esta es una hormona producida por las células de Sertoli que inhibe la liberación de FSH (Allen, 1992) mediante el control de mando de SNC por medio de un mecanismo retroalimentación negativa simple (Fayrer, 1996).

III. FISIOLÓGÍA DE LA REPRODUCCIÓN.

3.1. Espermatogénesis.

La producción de células espermáticas testiculares esta controlada por los factores de liberación hormonal [GnRH], que regula la secreción de FSH e ICSH en la hipófisis anterior (Allen, 1992; Fayrer, 1996; England *et al.*, 2000).

Constituye un proceso complejo mediante el que se producen los espermatozoides [células germinativas masculinas] en los tubos seminíferos de los testículos; Davol, 2001).

Las células llamadas espermatogonias, que son las precursoras de los espermatozoides, se dividen mediante mitosis para dar origen a los espermatocitos [las células con 78 cromosomas son llamadas diploides; en este número se incluyen los dos cromosomas sexuales], éstos se dividen posteriormente mediante meiosis por lo que el número normal de cromosomas se reduce a la mitad [39, se denominan como haploides con la mitad del número normal de cromosomas] formando las espermatidas y se mezcla el material genético procedente de los padres del individuo (Allen, 1992).

La espermiogénesis [una subdivisión de espermatogénesis] involucra la maduración de espermatidas inmaduras para producir espermatozoides maduros fértiles normales (Fayrer, 1996) mediante un complejo reagrupamiento

de los organitos; básicamente el núcleo pasa a formar la cabeza del espermatozoide, el aparato de Golgi forma el acrosoma, y las mitocondrias y centriolos intervienen en el desarrollo de la cola; la mayor parte del citoplasma queda en las células de Sertoli que aparecen sobre la membrana basal de los tubos seminíferos; regulan la metamorfosis de espermátida a espermatozoide (Allen, 1992).

La espermatogénesis comienza a los 4 meses de edad aunque los espermatozoides no aparecen en el eyaculado hasta los 10 a 12 meses (Allen, 1992), marcando el inicio de la pubertad, por aumento en el nivel de ICSH induciendo a los testículos para producir testosterona que llevará a la maduración de los espermatozoides (Daval, 2001).

En todos los mamíferos domésticos se ha definido el periodo de tiempo que se requiere para el desarrollo de células germinales primordiales, es decir, el ciclo de la espermatogénesis, desde la división del espermatogonio hasta la aparición del espermatozoide en el eyaculado, tarda 50 a 60 días; es el mismo tiempo que se requiere para el toro y el semental. Comprende dos fases, la primera denominada fase testicular es de ± 46 días, mientras que la segunda que es la fase epididimal es de ± 14 días en la cual se lleva a cabo la maduración de los espermatozoides en el epidídimo (Allen, 1992; Fayrer, 1996).

3.2. Control de la Temperatura.

La espermatogénesis no puede producirse con la temperatura normal del organismo en la mayoría de los mamíferos, varios mecanismos mantienen los testículos del perro más fríos que el resto del organismo (Allen, 1992).

Los testículos se alojan fuera de la cavidad corporal en el saco escrotal (Allen, 1992). El tejido muscular especializado del saco escrotal como el músculo cremaster influye sobre la distancia que media entre el cuerpo y el testículo, y el

músculo dartos en la pared escrotal que puede influir sobre el tamaño del escroto y, en consecuencia sobre la posición de los testículos. En el escroto, la disposición de los vasos sanguíneos en el cordón espermático permite la refrigeración de la sangre arterial mediante el retorno sanguíneo en el plexo pampiniforme manteniendo la temperatura de la sangre por debajo de temperatura corporal normal (Allen, 1992; Davol, 2001). Esto facilita el desarrollo óptimo [espermatogénesis] de los espermatozoides (Davol, 2001).

Las condiciones que provocan una elevación de la temperatura corporal, como fiebre (Allen, 1992) y choque por calor, pueden no ser compensadas por estos mecanismos y alterar la espermatogénesis, produciendo células espermáticas anormales (Allen, 1992; Fayrer, 1996) es decir no habrá espermatozoides normales hasta que se produzcan nuevas células en la fase espermatogénica subsecuente 50 a 60 días después (Fayrer, 1996). También la obesidad puede reducir la refrigeración testicular (Allen, 1992).

La evaluación de un perro que ha estado bajo estrés por calor necesitará ser evaluado después de 60 días para hacer un diagnóstico de fertilidad válido. También es importante recordar que en el caso de estrés por calor agudo todos los espermias del epidídimo morirán. Así el perro será temporalmente estéril durante 14 días (Fayrer, 1996).

3.3. Transporte del esperma.

Los espermatozoides llegan inmaduros a la cabeza del epidídimo; presentan una gotita de plasma residual llamada gota o perla citoplásmica residual. Las células maduran durante su paso a lo largo del epidídimo que se debe posiblemente a la producción constante de más esperma en el testículo. Al entrar en el conducto deferente la gota citoplásmica se mueve hacia el extremo distal de la pieza media o es expulsada del espermatozoide, que ahora se considera maduro. Se desconocen los factores que influyen sobre la velocidad

con que se mueven estas células a lo largo del conducto deferente (Allen, 1992).

Durante la eyaculación, el esperma se arrastrará del epididimo a través del conducto deferente y se combinará con el semen, secretado por la glándula de la próstata, en la uretra de la próstata antes de expelerse (Davol, 2001).

Los espermatozoides que no son evacuados mediante la eyaculación se piensa que son forzados hacia la abertura del conducto deferente y a penetrar en la uretra con la masa de células que existe detrás de los mismos, posteriormente van cranealmente hacia la vejiga y son expulsados junto con la orina (Allen, 1992).

Durante la eyaculación los espermatozoides son expulsados de forma activa desde el conducto deferente al interior de la uretra. (Allen, 1992; Davol, 2001).

3.4. Próstata.

Los perros sólo tienen una sola glándula sexual adicional, la próstata (Sisson *et al.*, 1993; Fayrer, 1996; Esquivel *et al.*, 2001) que produce una secreción transparente que es expulsada al interior de la uretra, conocida como tercera fracción del eyaculado. Su función consiste probablemente en arrastrar a la segunda fracción rica en espermatozoides, desde la vagina craneal hacia el útero de la perra, neutraliza la acidez uretral por ser una sustancia alcalina, ayuda a la activación de los espermatozoides y otorga el olor característico al semen (Adams, 1988; Allen, 1992).

3.5. Erección.

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 nerviosas aunque no se conocen en una forma completa (Allen, 1992).

El perro tiene estructuras únicas en el pene para facilitar la cruce y la unión. El *os penis* le permite lograr la penetración sin tener una erección completa gracias a su rigidez. La erección total se produce posteriormente para asegurar que el pene quede inserto en tracto genital de la hembra (Allen, 1992; Fayrer, 1996).

Una erección antes de la penetración produce a menudo una unión infructuosa. El perro con el pene erecto no puede, normalmente, lograr la penetración (Fayrer, 1996).

La erección consiste en la tumescencia (hinchazón y turgencia) del pene como resultado de una acumulación de sangre en sus tejidos provocada por la constricción del retorno venoso. (Allen, 1992).

Lo primero que aparece es un engrosamiento del bulbo del glande y una extensión del proceso uretral. 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. El bulbo del glande se alarga tanto que no puede ser retirado de la vagina; por tanto, el macho y la hembra quedan "enlazados" juntos durante 5 ó hasta 60 min. La detumescencia del bulbo ocurre antes que en la corona y en el collar (Sisson *et al.* 1993).

Tan solo después de amainar la erección puede separarse el perro de la hembra (Allen, 1992).

3.6. Producción de Esperma en el semental.

En el semental, la producción de espermatozoides se relaciona directamente al tamaño testicular. El espermatozoides se guarda en los compartimientos extragonadales del epidídimo y el conducto deferente. La cantidad de espermatozoides reservada dependerá de la frecuencia y interludios entre eyaculaciones. Las cuentas de espermatozoides totales en un macho sexualmente descansado abarcan reservas de espermatozoides más espermatozoides diario producido por los testículos. Las reservas de espermatozoides se vacían según informes recibidos una vez por 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 espermatozoides por los testículos (Davol, 2001).

3.7. Eyaculación.

Las contracciones del músculo uretral impulsan a los fluidos procedentes de los conductos deferentes y de la próstata a entrar y avanzar a lo largo de la uretra. El eyaculado consta de tres fragmentos (Allen, 1992) de aspecto muy diferentes, son emitidas sucesivamente: fracción uretral, epididimaria [espermática] y prostática (Fontbonne, 1996; Ward, 2000), la cual aparece después de una breve pausa. Es posible pues, para el veterinario fraccionar la colección (Fontbonne, 1996).

No hay ninguna glándula seminal en el perro y así los cánidos son los únicos que no tienen fructosa en su eyaculado (Fayrer, 1996).

3.7.1. Primera Fracción.

La primera fracción del eyaculado también llamada fracción preespermática, es un fluido claro (Allen, 1992; Ward, 2000; Davol, 2001), formado de la derivación de las glándulas uretrales (glándulas de Littre) (Fayrer, 1996); su función puede

ser la de lavar la vagina de restos de orina. Se elimina durante la excitación sexual inicial, su volumen es variable aunque generalmente es de 0.5 (Allen, 1992) a 3 ml (England *et al.*, 2000); 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 (Allen, 1992).

3.7.2. Segunda Fracción.

La segunda fracción es eyaculada generalmente tras la penetración cuando el macho deja de empujar (Allen, 1992), es la porción del eyaculado rica en espermatozoides de color blanco (Allen, 1992; Fayrer, 1996; England *et al.*, 2000; Ward, 2000; Davol, 2001) y su volumen suele ser de 0.5 a 1 ml (Allen, 1992), aunque England *et al.* (2000) menciona un volumen de hasta 6 ml; procede de los conductos deferentes y es depositada en la mitad anterior de la vagina al completarse la erección del pene; durante y poco después de la eyaculación de esta fracción, el perro desea girar instintivamente (Allen, 1992).

3.7.3. Tercera Fracción.

Procede de la próstata suele ser expulsada mientras los perros permanecen en pie, grupa con grupa y unidos, su volumen puede ser de 15 a 20 ml en razas grandes y depende probablemente del tiempo que permanecen unidos (Allen, 1992); es un fluido claro (Ward, 2000; Davol, 2001).

Se considera que esta fracción tiene como finalidad lavar el esperma hacia el interior del útero; sin embargo no siempre es favorable el efecto de esta fracción sobre los espermatozoides al final de la eyaculación se produce la desinflamación del pene y su retirada (Allen, 1992).

IV. EVALUACIÓN DEL SEMENTAL.

La reproducción es una función altamente especializada y es preciso lograr el exacto equilibrio entre la sanidad y la nutrición para que el animal pueda expresar completamente su capacidad reproductiva (Stornelli *et al.*, 2001). De tal manera que la reproducción en cualquier especie para que se pueda llevar a cabo en forma eficaz debe considerar que ambos sexos funcionen igualmente de manera adecuada (Davol, 2000; Esquivel *et al.*, 2001).

Aun cuando la inseminación artificial con semen preservado en los perros no ha alcanzado el grado tan avanzado de comercialización y utilización como en los bovinos es importante la evaluación de los sementales (Esquivel *et al.*, 2001).

Para el caso de la colección del semen para preservación, es muy importante una evaluación completa del semental que debe incluir un examen clínico general, un examen físico de genitales de genitales, de libido [su conducta para copular] y del eyaculado [este último de revisara a detalle en el capítulo VI], que nos permitan descartar desórdenes genéticos específicos de la raza que no sólo pueden impactar la calidad de vida de la descendencia futura sino que también comprometen la función reproductora del semental (Davol, 2000; England *et al.*, 2000; Esquivel *et al.*, 2001); también, los machos propuestos para reproducción deben recibir un examen físico completo para evaluación ortopédica, neurológica, endocrinológica, y del sistema genital antes de engendrar (Davol, 2001).

4.1. Examen Clínico General.

El examen clínico completo sirve para determinar que el semental sea un animal saludable, y que tenga una condición física favorable, ya que el trabajo de un semental implica mucha actividad física. El animal en primer lugar deberá

tener un peso adecuado a su raza, talla y edad, que no esté muy gordo ya que se cansará mas pronto o demasiado bajo de peso pues no tendrá energía para llevar a cabo el esfuerzo que significa la monta o la colección del semen (Esquivel *et al.*, 2001).

4.1.1. Historia Clínica.

Una historia clínica pertinente es esencial y útil para construir una lista de diagnósticos diferenciales (England *et al.*, 2000).

Debe incluir historia reproductiva anterior, éxitos anteriores como progenitor, tratamientos e historial médico general. Su historia reproductiva debe estar documentada para evaluar al semental; en particular, análisis de la frecuencia y número de montas por unidad de tiempo y la fecundidad aparente de estas uniones (Fayrer, 1996; England *et al.*, 2000).

4.1.2. Examen Físico

Como con cualquier examen masculino, un examen físico completo del animal es esencial (Fayrer, 1996). La nutrición apropiada y condición física son fundamentales para asegurar la actuación óptima y fertilidad en el macho (Davol, 2001; Esquivel *et al.*, 2001).

Es muy importante verificar que la función cardiaca y respiratoria sean normales, asimismo la integridad de los miembros locomotores, articulaciones y columna dorsal. Un animal que sienta dolor al montar a la hembra va a perder interés para hacerlo, y desde el punto de vista de la nutrición, hay que recordar que la reproducción se lleva únicamente cuando están cubiertos los requerimientos esenciales para el mantenimiento del animal (Esquivel *et al.*, 2001).

Además de una inspección minuciosa de los genitales que debe comprender el escroto, testículos, epidídimo, prepucio, pene, próstata.

Escroto: Se revisará que el escroto sea suave, no engrosado, que no estén los testículos adheridos al mismo, oprimiéndolos suavemente de manera que el testículo suba y al soltarlo baje sin ningún obstáculo. Los testículos que no tengan movilidad dentro del escroto pueden tener adherencias que impidan un control adecuado de la temperatura y que por lo tanto puede verse afectada su producción espermática (Esquivel *et al.*, 2001).

Testículos: Deben compararse en tamaño y consistencia (England *et al.*, 2000). Tienen forma ovoide, en posición oblicua y con la cola del epidídimo hacia atrás, no se encuentran colocados uno al lado del otro, sino que uno está ligeramente más hacia delante. Deberán sentirse firmes y turgentes, esto es, que al oprimirlos regresen inmediatamente a su forma normal. En un animal sano los testículos que se sientan planos pueden indicar hipoplasia, o sea falta de desarrollo, especialmente si el animal no tiene antecedentes de haberse reproducido anteriormente. Si el animal no está sano y por alguna circunstancia está bajo de peso, sería normal encontrarlos pequeños o planos o muy suaves a la palpación, ya que cuando los animales bajan su condición física, los testículos pueden perder temporalmente su capacidad de producción espermática y una vez que el animal se recupera ésta función puede recuperarse también. Los testículos muy duros pueden indicar una atrofia testicular (Esquivel *et al.*, 2001).

Los testículos tienen la capacidad de conservar una zona de reserva dentro de los tubos seminíferos, de tal forma que son capaces de recuperarse siempre y cuando la causa que haya dañado los testículos no altere esta zona de reserva. Una causa importante de daño a esta zona es la exposición a la radiación, ya que entonces se llevara a cabo el proceso de replicación celular o sea la mitosis y la meiosis pero en forma desordenada, que no únicamente originará

tumoraciones sino que en forma más peligrosa puede causar daño al material cromosómico contenido en los espermatozoides; por esta situación se puede producir una progenie defectuosa. Esto es especialmente importante para todos los veterinarios que manejan aparatos de rayos X (Esquivel *et al.*, 2001).

Epidídimo: Debe atarse uniformemente a la superficie dorso lateral del testículo. Como seña particular la cola del epidídimo es normalmente del tamaño de un frijol (England *et al.*, 2000).

Se revisará el epidídimo en su trayecto para determinar que este completo y que no le falte algún segmento, en forma especial la cola del epidídimo para determinar que esté lleno, pues indicará su capacidad de almacenamiento espermático (Esquivel *et al.*, 2001).

Prepucio: El prepucio deberá cubrir por completo el pene, hay que revisar que no tenga laceraciones o erosiones y además que a través de su orificio se permita la salida y entrada del pene (fimosis, parafimosis). Debemos recordar que es normal una ligera secreción purulenta, ya que es el resultado del proceso de renovación normal de la mucosa prepucial (Esquivel *et al.*, 2001).

Palpe el prepucio y pene externamente para asegurarse que no haya ninguna masa o adherencias (Fayrer, 1996).

Pene: Debe exponerse no erecto para la inspección (Fayrer, 1996; England *et al.*, 2000) desenvainándolo jalando el prepucio hacia atrás para verificar que no haya obstáculos que impidan que desenvaine (Esquivel *et al.*, 2001), asegúrese que la mucosa superficial no tenga ninguna lesión significativa. Un ejemplo de una lesión importante sería una masa roja pedunculada cancerosa que en toda seguridad sería un tumor venéreo transmisible [TVT]. También, mientras el pene es exteriorizado y en estado no erecto, examine la integridad del *os penis* (Fayrer, 1996).

Próstata: Es la única glándula accesoria que posee el perro. Se encuentra rodeando el cuello de la vejiga, su posición de la próstata es inconstante, aunque normalmente se localiza en el borde craneal de la pelvis en perros jóvenes, es redondeada, lisa, simétrica con un rafe medio que la divide en 2 lóbulos iguales (Fayrer, 1996; England *et al.*, 2000; Esquivel *et al.*, 2001).

La posición de la próstata varia. Cuando la vejiga esta vacía y contraída, la glándula está totalmente en la cavidad pelviana y puede tener 2,5 cm o más, caudal al borde craneal del pubis. Cuando esta llena, la próstata se halla en posición casi totalmente prepúbica (Sisson *et al.*, 1993).

En muchos casos, los perros especialmente más viejos, la próstata no es intrapélvica (Fayrer, 1996).

La palpación puede ser realizada con éxito manipulando la próstata abdominalmente en la pelvis o por palpación rectal digital (Fayrer, 1996; England *et al.*, 2000; Esquivel *et al.*, 2001).

Está propensa a padecer cambios patológicos que también originan un aumento de su tamaño; suele ser difícil determinar si se ha producido o no crecimiento anormal (Allen,1992). Un aumento en tamaño normalmente ocurre con el avance de la edad (England *et al.*, 2000).

La asimetría de la glándula, dolor o consistencia anormal pueden indicar una disfunción y requerir una revisión más minuciosa de la glándula (Fayrer, 1996; Esquivel *et al.*, 2001).

La hiperplasia quística prostática es un hallazgo sumamente común en animales geriátricos y el diagnóstico subsecuente y el tratamiento es esencial. En andrología humana se han perfeccionado las evaluaciones precisas y

rápidas de la condición de la próstata mediante ultrasonido transrectal, y está aplicándose al perro (Fayrer, 1996).

4.1.3. Examen Clínico.

El examen reproductivo completo se está volviendo un aspecto importante de reproducción en animales pequeños. Esto es especialmente verdad cuando nosotros reconocemos que el semental infectado puede infectar perras y puede provocar infertilidad o daño reproductivo. De la misma manera, una evaluación incorrecta de un semental puede difamar su fertilidad (Fayrer, 1996); de tal manera que un examen clínico es obligatorio para eliminar la sospecha de una enfermedad sistémica generalizada (England *et al.*, 2000).

Se deben efectuar pruebas en busca de *Brucella canis* en todos los machos que presenten insuficiencia reproductiva, orquitis, dermatitis escrotal crónica (Birchard *et al.*, 1996; Fayrer, 1996) y aglutinación de esperma que están asociados con algunas causas de esterilidad (Ward, 2000).

Las infecciones por *B. canis* pueden causar orquitis, epididimitis, atrofia testicular, discoespondilitis, linfadenopatía generalizada o fiebres de origen desconocido. Para seguimientos se emplean pruebas séricas de aglutinación; sin embargo, es posible observar resultados falsos positivos, el diagnóstico se confirma con la prueba de inmunodifusión en agar gel (Birchard *et al.*, 1996).

Pueden usarse varias técnicas para investigar enfermedades reproductivas en los perros. Las muestras de semen proporcionan una forma de biopsia e información diagnóstica sobre función testicular y prostática. Las biopsias testiculares convencionales pueden ser obtenidas por incisión o aspiración con aguja pero no es aconsejable en animales reproductores puesto que le siguen respuestas inflamatorias marcadas. En particular, las biopsias de incisión pueden causar inflamación local con degeneración tubular, fibrosis y

oligospermia. La medida de hormonas en suero (o plasma, ambos son prácticamente intercambiables) pueden usarse para confirmar fallas testiculares. Sin embargo las concentraciones séricas de testosterona, LH, y FSH fluctúan notablemente, muestras seriadas o la respuesta de testosterona sérica a la administración de HCG o GnRH puede ser valiosa (England *et al.*, 2000).

En perros castrados, los valores de testosterona son siempre inferiores a 200 pg/ml (Allen,1992). Las células de Leydig responderán a varios agentes como la hormona luteinizante para producir testosterona. Para diagnosticar la presencia de un testículo ectópico no identificado, se tomará una muestra de sangre heparinizada, administrando a continuación por vía intravenosa 500 a 2000 UI de gonadotropina coriónica humana [hCG]; una hora más tarde se toma una segunda muestra. Una elevación en la concentración de testosterona hasta por arriba de 6 ng/ml indica la presencia de tejido testicular (Allen,1992; Fayrer, 1996).

El tracto reproductor masculino también se puede radiografiar (con la advertencia que la radiación iónica causa degeneración testicular) y más recientemente, la ultrasonografía también ha demostrado ser valioso en examen de próstata y del testículo. Una evaluación más completa de la glándula de la próstata puede ser lograda por aspiración con aguja o biopsia de la glándula, usando ultrasonido como guía especialmente. Las células prostáticas también pueden ser colectadas por masaje rectal y lavado uretral. Inicialmente, un catéter uretral se pasa a la vejiga para permitir desagüe de orina después se llena con solución salina. Seguidamente, el catéter se retira parcialmente hasta que su punta este dentro de la próstata distal, determinando la posición por palpación rectal. Entonces se da masaje a la próstata por el recto o transabdominalmente durante uno a dos minutos. Cinco a diez ml de solución salina estéril se introduce entonces a través del catéter aunque comprimiendo la uretra, distal a la próstata con un dedo por el recto. De esta

manera, se vacían células masajeadas de la glándula de la próstata en la vejiga. Estas células son recuperadas entonces adelantando el catéter y aspirando el volumen de la vejiga (England *et al.*, 2000).

4.1.4. Valoración de la Líbido.

La disposición del semental para copular debe ser evaluada, existen diversos factores que ocasionan en el semental una disminución de la libido como el aburrimiento, el cansancio, estrés, dominancia, inexperiencia, familiarización y preferencia alterando las respuestas favorables por parte del semental. Por lo que la solución de los problemas de libido deben de considerarse principalmente como una alteración de comportamiento antes que una endocrinopatía, sin descartar la posibilidad de que también exista esta situación. En ocasiones un cambio de rutina es favorable (Davol, 2000; Esquivel *et al.*, 2001).

V. COLECCIÓN DEL SEMEN.

La colección de semen es esencial para la inseminación artificial, y es de importancia cardinal en el examen reproductivo completo (England *et al.*, 2000).

La colección de semen no debe exceder de una vez cada dos días. La eyaculación diaria produce concentraciones muy bajas de eyaculado después de cinco a siete días. (Martin, 1996) por lo que es recomendable un descanso sexual antes de la colección de semen y evaluación (England *et al.*, 2000).

Los mejores candidatos son los perros experimentados y seguros para colecciones de calidad. Algunos perros pueden ser difíciles de coleccionar, y pueden requerirse esfuerzos repetidos (Martin, 1996).

5.1. Requisitos para la Colección.

5.1.1. Hembra Celadora [Teaser].

Durante el estro, se excretan compuestos orgánicos conocidos como feromonas de la vagina de la hembra. Estos químicos aerotransportados son responsables para atraer a los machos de distancias largas a la hembra. Estos incluso indican la fase de su calor (Foster *et al.*, 2001).

La recolección del semen se ve altamente facilitada por la presencia de una hembra en celo o en la fase final del proestro o estro (Allen, 1992; Fontbonne, 1996; England *et al.*, 2000; Greenbank *et al.*, 2000; Corona, 2001; Davol, 2001; Foster *et al.*, 2001). Además, se obtiene la mejor calidad de eyaculado (Fayrer, 1996).

Aunque ésta no deba estar forzosamente en pleno estro, ya que un ligero olor asociado a una estimulación mecánica digital hábil, resulta en la mayoría de los casos suficiente para alcanzar la erección. (Fontbonne, 1996).

Esta, preferentemente, debe ser una perra de tamaño similar y de temperamento tranquilo (Fayrer, 1996; England *et al.*, 2000).

5.1.2. Feromonas.

La disponibilidad de una perra en estro precisamente cuando se necesita puede ser difícil y a menudo imposible (Fayrer, 1996; England *et al.*, 2000; Foster *et al.*, 2001).

Alternativamente, una perra no estral de la misma raza y tamaño puede usarse (England *et al.*, 2000) si es impregnada con una feromona canina tópica comercial basada en metil-p-hidroxibenzoato [Eau d'estrus, Synbiotics

corporation] (Allen, 1992; England *et al.*, 2000) y se le permite olfatear a la vulva (Davol, 2001); también el ácido metil ester hidroxibenzoico funciona (Corona, 2001).

Otra práctica común es preservar hisopos de algodón o gasas de algodón que han sido impregnadas en la vagina de una hembra cuando estaba en su pico estral son congeladas y puestas en bolsas zip-lock hasta que sean requeridas. (Fayrer, 1996; Foster *et al.*, 2001). La perra en estro debe ser negativa a *Brucella* (Fayrer, 1996).

Al momento de la colección de semen, simplemente se coloca delante del hocico del perro (Allen, 1992) o pueden pasarse alrededor del área de la cola de cualquier perra o perro (incluso uno castrado) el macho responderá entonces a ella así como si ella estuviera en calor (Foster *et al.*, 2001).

5.1.3. Lugar.

Los perros sin experiencia es improbable que eyaculen el perro suele ser llevado a un lugar que le resulte extraño, donde no está acostumbrado a trabajar hecho que puede inhibir incluso a un perro experimentado. (Allen, 1992). Por lo que es muy importante elegir un sitio conocido por el perro (Corona, 2001).

La recolección debe realizarse en un lugar no muy grande, con piso antiderrapante y sin ruidos, ya que el perro con frecuencia muestra un comportamiento púdico (Fontbonne, 1996; England *et al.*, 2000).

Las razas pequeñas suelen aparearse sobre una mesa provista de una superficie adecuada las razas grandes se aparean sobre el suelo con distintos grados de ayuda por parte del hombre (Allen, 1992); muchos animales se inhiben al ser subidos a una mesa (Fontbonne, 1996).

5.1.4. Preparación del Equipo.

Es esencial mantener la esterilidad en todo momento. Todo el equipo utilizado debe ser apropiadamente esterilizado con gas o calor. En la mayoría de los casos, todos los artículos de látex deben ser esterilizados con gas (óxido de etileno) y seguidamente aireados durante por lo menos 2 a 3 semanas (Fayrer, 1996; Davol, 2001).

Se debe calentar y aislar el equipo de colección para asegurar que las muestras colectadas no reciban choque por temperatura (Fayrer, 1996; England *et al.*, 2000).

También, muchos elementos del equipo son tóxicos para el esperma canino. Por consiguiente, todos los tubos de plástico, jeringas y pipetas deben probarse antes de su uso rutinario (England *et al.*, 2000).

Es importante notar que ciertos factores externos como temperaturas extremas, exposición a los lubricantes y químicos encontrados en látex y recipientes de plástico usados para la colección de esperma pueden afectar adversamente el esperma o su motilidad. Por consiguiente, los dueños de sementales que utilizan dispositivos caseros para la colección de semen deben asegurarse de que los materiales usados no tengan efectos colaterales tóxicos sobre los espermatozoides; esto también se aplica a los métodos por desinfectar el equipo (Daval, 2001).

5.2. Equipo Necesario.

Allen (1992) sugiere el siguiente equipo como necesario para la colección de semen canino:

- 1 o 2 embudos de cristal o plástico
- 1 o 2 tubos de ensayo de cristal o plástico, el plástico es irrompible aunque debido a su peso ligero puede ser desalojado de la mano por la cola o una extremidad del perro
- Un baño maría, mantenido preferentemente de forma automática a 37° C.
- Un soporte para tubos de ensayo en el baño María
- Porta objetos y cubre objetos
- De forma ideal, un dispositivo calentador capaz de mantener un cubreobjeto a 37° C (una botella plana llena de agua caliente puede servir para colocar los porta objetos sobre la misma y mantenerlos calientes)
- Pipetas
- Colorante nigrosina eosina
- Un microscopio con objetivo de inmersión para grandes aumentos
- Una cámara Neubauer para recuento de células
- Equipo para diluir el esperma a 1/200

Casi cualquier receptáculo caliente puede usarse para coleccionar el semen pero la mayoría de las bolsas "whril pak" estériles se usan. Jeringas y otros objetos duros deben evitarse como el pene es fácilmente traumatizable durante la colección y puede aparecer un sangrado sustancial en el eyaculado. Esto no parece decrecer la fertilidad en perros pero interfiere con la evaluación de semen y por supuesto, alarma a los dueños (England *et al.*, 2000).

El material más sencillo para colectar el semen es un embudo y un tubo de ensayo de vidrio y un guante para manipular el pene con la mano enguantada. Es más práctico el embudo de látex (Esquivel *et al.*, 2001).

Synbiotics Corporation fabrica equipo para la colección de semen. Típicamente, el dispositivo consiste en un cono de caucho adherido a un tubo centrífugo de plástico (Davol, 2001).

5.3. Métodos de Colección del Semen

5.3.1. Manual.

Un excelente eyaculado puede obtenerse solo de colección manual. El semen canino es fácilmente colectado mediante masturbación con mano enguantada o desnuda (Fayrer, 1996; Martin, 1996; England *et al.*, 2000). Además de obtenerse un excelente eyaculado (England *et al.*, 2000) es el método de elección en el caso del perro (Fontbonne, 1996; Esquivel *et al.*, 2001).

5.3.1.1. Preámbulo.

Cuando colectamos el semen canino, es esencial recordar varios hechos. Primeramente, el pene del perro contiene un hueso peniano ligeramente frágil que queda en la porción ventral del eje del pene y se extiende del extremo del bulbo del glande hasta cerca de la punta del glande (Sisson *et al.*, 1993; Fayrer, 1996). El hueso peniano permite introducir el pene parcialmente erecto en la vulva antes de completar la erección. Un hueso peniano excesivamente pequeño o dañado limitarán la capacidad del perro como semental (Fayrer, 1996).

Es esencial identificar y reconocer la importancia del bulbo del glande. El bulbo está en el eje proximal del pene y es capaz de crecer de 2 a 3 veces su tamaño durante la erección. El bulbo normalmente no crece hasta que la penetración se ha completado. En ese momento, la expansión del bulbo dentro de la vulva y las contracciones musculares de la vulva permiten formación de la cerradura genital. La posición del bulbo en el vestíbulo vaginal constituye a la unión (Fayrer, 1996).

Las uniones pueden clasificarse como externas e internas. Una unión interna es el resultado de penetración completa y mantenimiento del bulbo dentro de la porción vestibular del tracto reproductor. Frecuentemente debido a muchas razones, incluso inexperiencia o erección prematura o un bulbo excesivamente grande, no forma una cerradura genital completa; esto se denomina una unión externa (Fayrer, 1996).

El perro, una vez establecida la cerradura genital, se colocara de tal manera que ambos quedan en posición caudo caudal. Esto es facilitado por la porción fibroelástica del pene proximal al bulbo que puede rodar 180° sobre su eje horizontal. Es indispensable hacer completamente familiar el hecho que éste es un plano horizontal de movimiento. Mientras se realiza la colección el perro caminará a menudo encima de la mano del colector como en una unión normal no se debe intentar mover el pene en cualquier forma de arco ventral; el movimiento natural es un giro de 180° del pene en un plano horizontal, es decir, paralelo a la espina dorsal (Allen, 1992; Fontbonne, 1996; Fayrer, 1996).

5.3.1.2. Técnica.

La perra celadora se sujeta convenientemente por la cabeza o por el cuello por un ayudante (Allen, 1992; Fontbonne, 1996), se deja que el perro olfatee y lama la vulva de la perra (Allen, 1992; England *et al.*, 2000).

La masturbación y la colección se realizan mejor con su mano de escritura, posiciónese en el lado apropiado del perro (Fayrer, 1996).

Cuando el perro se muestra interesado, y antes de que intente montar a la perra en el momento en el que el perro desenvaine se sujeta su pene (Allen, 1992; England *et al.*, 2000; Esquivel *et al.*, 2001; Foster *et al.*, 2001) generalmente con la mano derecha del colector (si es diestro), situado en el lado izquierdo del perro (Allen, 1992; Fayrer, 1996).

Se estimulará el pene del perro a todo lo largo con movimiento craneo caudal, al mismo tiempo que se va desenvainando, una vez que el pene este libre del prepucio se rotará suavemente hacia atrás en un plano horizontal hasta que se dirija caudalmente (Fayrer, 1996; Esquivel *et al.*, 2001). Normalmente, se dirige al lado al que el perro está intentando caminar encima del pene como lo haría normalmente en una unión normal (Fayrer, 1996); aunque según Fontbonne (1996) la inversión del pene hacia atrás no siempre es necesaria.

La fuerza de presión es inconstante y es mejor empezar suavemente y aumentar a efecto. (Fayrer, 1996), se seguirá estimulando detrás y encima del bulbo, hasta que eyacule el perro (Esquivel *et al.*, 2001).

Si el bulbo del glande aparece tumefacto, el prepucio será empujado hacia atrás para dejar expuesto todo el glande (Allen, 1992), con ayuda del empuje pelviano, aunque este puede estar ausente (Fayrer, 1996).

De no haber ningún empuje el prepucio debe cambiarse de sitio detrás bulbo antes de que agrande excesivamente y se haga imposible el desplazamiento caudal. El desplazamiento del prepucio facilita la colección y mejora la calidad del eyaculado. (Fayrer, 1996)

Si el bulbo del glande no aparece tumefacto, se realizaran masajes sostenidos sobre el prepucio (Allen, 1992; Fontbonne, 1996) asegure que el prepucio aloje proximalmente al bulbo, como en la unión normal. También puede hacer una presión gentil alrededor de la base del bulbo para estimular una erección completa y esta normalmente se asocia con varios grados de vigor en el empuje pelviano. (Fayrer, 1996)

Si el bulbo del glande aparece demasiado inflamado no es posible sacar el glande del prepucio; el perro será separado de la hembra hasta que halla

remitido la erección o puede intentar colectar el semen con el glande en el interior del prepucio; este proceso puede resultar incomodo para el perro (Allen, 1992; England *et al.*, 2000); por lo que es mejor estar seguro que el bulbo este fuera del prepucio antes de que se extienda (England *et al.*, 2000).

Tras exponer el bulbo del glande (Allen, 1992; England *et al.*, 2000), se sujeta la base del glande entre los dedos índice y pulgar; reproduciendo la coaptación vaginal que se produce durante el coito (Fontbonne, 1996) se mantiene sujeto con firmeza o se le aplican contracciones rítmicas (Allen, 1992) masturbándolo firmemente al punto de erección completa y muestre empuje pelviano (Fayrer, 1996).

La presión sobre la base en el pene estimulará la tumefacción del bulbo del glande con o sin movimientos de empuje por parte del perro (Allen, 1992; Fayrer, 1996). Si estos protocolos se siguen, la eyaculación empezará. (Fayrer, 1996)

Después de la erección se coloca un cono de colección sobre el pene (Fontbonne, 1996) o una bolsa de plástico (England *et al.*, 2000).

Con independencia de una tumefacción prematura del bulbo del glande un problema importante aparece cuando se intenta exponer el pene en razas de pelo largo, y a razas pequeñas en las que resulta difícil la sujeción del pene (Allen, 1992).

Durante los movimientos violentos de empuje no es momento para la colección del eyaculado por que será la primera fracción carente de espermatozoides, por lo que se elimina (Allen, 1992).

Si es colectada la primera fracción, puede comprobarse que se trata de un fluido claro (Allen, 1992; Fayrer, 1996; Davol, 2001) a ligeramente turbio de unas gotas hasta 3 ml (England *et al.*, 2000).

Tras la expulsión de la primera fracción se eyacula la segunda, rica en espermatozoides (Allen, 1992; Fayrer, 1996;) de color blanco con un volumen de 0.5 (Allen, 1992) a 6.0 ml, a menudo se mezcla con la primera fracción y sólo un eyaculado ligero gris opalescente es obtenido (England *et al.*, 2000) mediante 4 a 10 concentraciones uretrales; si es posible se recogerá por separado en el segundo tubo de ensayo (Allen, 1992). En esta fase ocurre el empuje pelviano más vigoroso (Allen, 1992; Fayrer, 1996).

Es esencial proteger el tubo colector durante la recuperación de semen guardándolo con la mano para mantenerlo cerca de la temperatura corporal y prevenir choque por frío. Secundariamente, la mano también protege el espermatozoide de los efectos sumamente perjudiciales de luz ultravioleta (Fayrer, 1996; England *et al.*, 2000).

En ocasiones el volumen de la primera fracción puede aproximarse a 5 ml; si posteriormente un perro nervioso no elimina la fracción rica en espermatozoides, será preciso hacer una colección posterior (Allen, 1992).

Tras la expulsión de la fracción rica en espermatozoides, pueden producirse varias contracciones uretrales no productivas hasta que es eyaculada la tercera fracción (Allen, 1992) que pueden palparse si se mantiene presión firme alrededor del bulbo; en el ano también se observarán contracciones rítmicas. El perro puede dejar de eyacular por varios minutos y las pulsaciones continuaran (England *et al.*, 2000).

Antes de eyacular el tercer fragmento el perro normalmente desmontara e intentara caminar encima del brazo del colector (Allen, 1992).

La tercera fracción es el fragmento prostático de color claro (Davol, 2001). Según Allen (1992) y Fayrer (1996) este fragmento puede variar en volumen de 1 a 20 ml y puede depender del protocolo de la colección; puede aumentar el volumen hasta aproximadamente 60 ml (England *et al.*, 2000).

Si la segunda fracción es muy concentrada y de pequeño volumen, pueden ser necesarios varios chorros de la tercera fracción para arrastrarla del embudo de colección y llevarla al tubo de ensayo (Allen, 1992).

La mayor parte de la tercera fracción es recogida en el tubo de ensayo que contiene la primera, o se deja que el perro acabe de eyacular sobre el suelo (Allen, 1992). Sin embargo, para la valoración completa de la función reproductora masculina, es a menudo aconsejable coleccionar el fluido prostático separadamente con el propósito de realizar un cultivo rutinario (Davol, 2001).

La eyaculación ocurre intermitentemente a través de un periodo inconstante, de 5 a 45 minutos y el volumen total puede variar de 1 a 40 ml (Fayrer, 1996; Fontbonne, 1996; England *et al.*, 2000).

Después de que la colección está completa, el macho se observa hasta que su erección disminuye (England *et al.*, 2000) y el pene sea reemplazado en el prepucio y prevenir desecamiento de mucosa peneal y trauma (Fayrer, 1996).

La Parafimosis puede ocurrir después de la colección si el prepucio queda distal al bulbo y este esta agrandado restringe su movilidad y es estrangulado por el prepucio sosteniendo la erección (Fayrer, 1996).

Si el pene esta expuesto, se lubrica el glande y se intenta reducir la parafimosis (Fayrer, 1996; England *et al.*, 2000)

El perro nunca debe ser enjaulado o enviado a casa hasta que el pene este completamente dentro del prepucio (England *et al.*, 2000).

5.3.2. Cono Artificial.

El tubo de ensayo puede unirse a un cono de látex, que se coloca sobre el pene del perro; este método no resulta ideal porque dificulta la colección de las fracciones por separado y porque el látex es tóxico para el esperma (Allen, 1992).

5.3.3. Vagina Artificial.

La dificultad de disponer de una extensa gama de tamaños de vaginas artificiales para poder ser usadas sobre animales cuyos tamaños pueden variar desde el Chihuahua al Gran Danés, alto costo del sistema y limpieza engorrosa. (Fontbonne, 1996), ocasionan que raramente una vagina artificial (VA) sea usada en las colecciones actualmente (Fayrer, 1996), sin embargo, algunos operadores encuentran la masturbación como un proceso desagradable y prefieren usar una vagina artificial (England *et al.*, 2000).

Se han descrito la obtención de mayores volúmenes de eyaculado obtenidos con vagina, pero no aparece incrementado el numero total de espermatozoides, por lo que tan sólo se consigue incrementar la parte prostática (Fontbonne, 1996).

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 esperma y la cubierta de látex que puede originar la inmovilidad total de los espermatozoides (Allen, 1992); ya que el látex es espermicida. Además, estas vaginas artificiales

no pueden ser esterilizadas porque los residuos de esterilización con gas también son tóxicos a los espermatozoides todo esto la hace no adecuada para colectar semen canino (England *et al.*, 2000).

5.3.4. Electroeyaculación.

La electroeyaculación permite obtener semen de todos los animales que poseen la vía neurológica implicada intacta. Sin embargo, una limitante es la necesidad de someter al animal a una anestesia general a fin de evitar las molestias que este método produce sobre el mismo. Este método se reserva solo para animales sanos, para los cuales el procedimiento implica un riesgo mínimo (Stornelli *et al.* 2002).

Kojima, *et al.* (2001) mediante un experimento para la colección y preservación de semen de oso japonés (*Ursus tibetanus japonicus*) uso un perro beagle como modelo encontró que la concentración espermática y la cuenta de espermatozoides total era más baja en semen coleccionado por electroeyaculación que en semen coleccionado por manipulación digital, pero su motilidad espermática, viabilidad y morfología eran similares.

5.4. Fracasos en la Colección.

El fracaso en la colección de una muestra puede desquiciar al perro y provocar un costo extra (Allen, 1992).

Los principales factores de fracaso en la recolección del semen en los perros proviene de la edad (animales muy jóvenes o muy viejos), la experiencia (primera obtención). Del medio ambiente por ruidos, conversaciones, suelos resbalosos, exceso de personas presentes y la visión de las batas blancas (Allen, 1992; Fontbonne, 1996; Corona, 2001). Otras causas provienen del comportamiento del animal por un exceso de agresividad y por un efecto

individual de la propia raza (las razas pequeñas son más tímidas). Los antecedentes patológicos como antiguas fracturas, cálculos uretrales y por último la ausencia de una perra en celo (Fontbonne, 1996).

La colección de sementales de bajo líbido incluso es difícil en la presencia de perras teaser y esto no es un buen presagio para su fertilidad (Fayrer, 1996).

VI. EVALUACIÓN DEL SEMEN.

Después de colectar el semen, las células espermáticas se verifican macroscópica y microscópicamente (Martin, 1996; Foster *et al.*, 2001).

6.1. Manejo del Semen.

Davol (2001) advierte que el semen, como con todos los fluidos corporales, debe manejarse como material biológico potencialmente peligroso. Pueden transmitirse muchos organismos bacterianos caninos a los humanos durante la colección de semen y por consiguiente, el semen presenta un riesgo de salud potencial. En consecuencia, es esencial que el individuo colector y evaluador de semen practique las "medidas universales básicas de bioseguridad" considerando el semen como potencialmente infeccioso y tomando medidas razonables para reducir riesgos de infección (utilizando equipo protector como guantes y anteojos, lavarse las manos, desinfección apropiada o disposición de todo el equipo contaminado como material biológico peligroso).

Todos los perros involucrados en la colección de semen deben todos negativos a *Brucella canis* (Fayrer, 1996).

6.2. Razones para la Evaluación.

Las indicaciones en las que un veterinario puede realizar el examen seminal son:

- Como parte del protocolo de inseminación artificial (Allen, 1992; Birchard *et al.*, 1996; Fontbonne, 1996; Corana, 2001).
- Para investigar el efecto de enfermedad prostática sobre la calidad del semen (Allen, 1992).
- Comprobar la calidad y producción del semen después de enfermedad o terapias (Allen, 1992; Corana, 2001).
- En los controles de fertilidad para confirmar la espermatogénesis normal de un perro joven antes de comenzar a usarlo como semental (Allen, 1992; Corana, 2001).
- Determinar la posible infertilidad de un semental (Allen, 1992; Birchard *et al.*, 1996; Fontbonne, 1996; Corana, 2001).

En los dos últimos casos el examen deberá de ser muy exhaustivo y completo, mientras que en la colección para IA solo será necesaria la parte inicial del espermiograma (motilidad individual y progresiva) (Birchard *et al.*, 1996; Fontbonne, 1996).

6.3. Limitaciones de la Evaluación.

La muestra debe mantenerse caliente (Allen, 1992; England *et al.*, 2000); debido a que un descenso rápido de la temperatura puede originar una alteración mediante choque por frío de los espermatozoides; esto es poco frecuente en el

semen del perro por ser relativamente resistente al frío; el semen suele recogerse a temperatura ambiente (Allen,1992) y se verifica poscolección inmediatamente (Fayrer, 1996) ya que la motilidad celular espermática disminuye en presencia de temperaturas menores a 30°C, y luz ultravioleta, hechos que proporcionarían una falsa impresión sobre la calidad de la muestra (Allen, 1992; Fayrer, 1996); lo que la hace dependiente de la temperatura (England *et al.*, 2000).

England *et al.* (2000) sugiere una temperatura convencional entre 37 a 39° C, sobre todo la última que es más apropiada ya que es la temperatura media en la vagina de las perras. Iguer *et al.* (2001) sugiere una temperatura de 38° C como más óptima para el análisis de semen.

6.4. Evaluación de la Muestra.

Ninguna característica por sí sola es una medida precisa de fertilidad, para que un macho se considere aceptable como semental, la evaluación del semen debe exceder los criterios mínimos sugeridos para porcentaje de motilidad de espermatozoides, concentración espermática por eyaculado y morfología del esperma (Birchard *et al.*, 1996).

Para evaluar el semen eficazmente se debe usar el fragmento espermático rico del eyaculado con la cantidad mínima de contaminación de fluido prostático. El semen debe coleccionarse bajo las condiciones óptimas y debe protegerse de los cambios en la temperatura y la luz (Fayrer, 1996).

6.4.1. Evaluación Macroscópica.

Se realiza inmediatamente postcolección e incluye volumen, color, olor y pH (Allen, 1992; Fayrer, 1996; Martin, 1996; England *et al.*, 2000; Corona; 2001).

6.4.1.1. Volumen.

El volumen de semen no es importante (England *et al.*, 2000) pues no está relacionado con la fertilidad (Corona, 2001), pero es necesario registrar el volumen espermático de la porción para que el número total de espermatozoides por eyaculado pueda ser calculado (England *et al.*, 2000).

Se mide en un tubo de ensayo graduado, comparando dicho tubo con el tubo de la muestra (Allen, 1992), en probetas graduadas o jeringas (Corona, 2001).

La fracción espermática puede medir desde 0.5 (Allen, 1992) hasta 6 ml, y a menudo se mezcla con la primera fracción o la tercera pudiendo aumentar el volumen hasta 60 ml (England *et al.*, 2000); varía de acuerdo a edad, tamaño del perro, frecuencia de colectas, cantidad colectada de líquido prostático, época del año, etc. (Corona, 2001).

Cuando se tiene experiencia, la consistencia de la muestra será una buena orientación para decidir si contiene un número suficiente de espermatozoides (Allen, 1992).

6.4.1.2 Color.

El color normal de semen es un blanco a blanco opalescente (Fayrer, 1996) y opaco (Birchard *et al.*, 1996) puede aparecer un sobrenadante prostático claro o blanco grisáceo homogéneo (England *et al.*, 2000); aunque, dependerá de la concentración espermática (Corona, 2001).

En caso de infección del aparato reproductor, el semen presenta una coloración verdosa (Birchard *et al.*, 1996; Fayrer, 1996; Corona, 2001) o verde amarillento que denota la presencia de neutrófilos (Fayrer, 1996), con grumos o sin ellos, hojuelas o coágulos (Birchard *et al.*, 1996).

Un color café tierra del semen denota a menudo una prostatitis y la infección coexistente (Fayrer, 1996).

Amarillo normalmente indica contaminación con orina (Fayrer, 1996; Corona, 2001), que es espermicida y tóxico para el esperma (Fayrer, 1996).

Puede apreciarse la coloración de la muestra con sangre (Allen, 1992) como una coloración rojiza que indica hemorragia o falla coagulativa (Corona, 2001). A este fenómeno se le denomina hemospermia y se debe determinar el origen del sangrado, ya sea por traumatismo peneano, prepucial, uretral o hemorragia prostática (Birchard *et al.*, 1996; Fayrer, 1996). El sangrar es a menudo inducido durante las colecciones rutinarias con la ruptura de los vasos sanguíneos pequeñas de la uretra y no debe ser un problema si no es recurrente (Fayrer, 1996).

Cualquier agente (orina, pus, sangre) que contamine el semen afecta la concentración, mortalidad y la vía de los espermatozoides (Birchard *et al.*, 1996).

6.4.1.3. Olor.

Su olor normal es característico, como a sosa o cloro, ligeramente aromático; su modificación es considerada patológica y por lo general es debido a contaminaciones (Corona, 2001).

6.4.1.4. pH.

Fontbonne (1996) menciona que el semen tiene un pH ligeramente ácido entre 6.4 y 6.6; sin embargo, Corona (2001) dice que es normal que se encuentre en

un rango de 6.3 a 7 y que dependerá de la cantidad de líquido prostático de la tercera fracción, además de evaluarse con tira reactiva.

6.4.2. Evaluación Microscópica.

El examen microscópico del espermatozoide debe realizarse inmediatamente después de recolectarlo (Birchard *et al.*, 1996) e incluye la evaluación de la motilidad, concentración, morfología (lo que las células individuales de espermatozoide parecen), de manera convencional, además, presencia de otras células (células prostáticas, células blancas de sangre, células rojas) y microbiología (Allen, 1992; Fayrer, 1996; Martin, 1996; England *et al.*, 2000; Corona, 2001).

6.4.2.1. Motilidad.

La motilidad se evalúa de una manera subjetiva con el porcentaje espermático expresado como un porcentaje de motilidad espermática progresiva (England *et al.*, 2000) y debe examinarse rápidamente, esta disminuye conforme el semen se enfría (Ward, 2000).

Para examinar la motilidad es esencial que el evaluador use un portaobjeto y cubreobjeto caliente (Fayrer, 1996).

El porcentaje de espermatozoides con movimiento activo se ve afectado por cambios extremos de temperatura, dilución en medios ácidos, presencia de agua, orina, pus, sangre o exceso de lubricante en el cono o vagina artificial (Allen, 1992; Birchard *et al.*, 1996; Corona, 2001).

El fluido prostático es un buen diluyente si se requiere para estimar la motilidad (Davol, 2001).

A) Motilidad Grosera.

Inicialmente, la motilidad grosera a poder bajo (10X) es evaluada poniendo una gota de esperma en el portaobjetos. El semen normal debe tener de 70 a 80% de motilidad y puede describirse como una ventisca revuelta por efecto del resultado de concentración de células espermáticas y motilidad. Ambos parámetros deben ser altos para ver los espermatozoides arremolinarse. Si se ha diluido el semen excesivamente con fluido prostático decrece la oportunidad de ver a los espermatozoides arremolinarse [movimiento ondulatorio] (Fayrer, 1996).

El semen del perro pocas veces resulta tan denso que determine el movimiento ondulatorio observado en el semen del toro o del carnero (Allen, 1992).

Calificación de la Motilidad Grosera.

La motilidad grosera se anota en una escala de 0 a 5. Absolutamente ningún movimiento de células espermáticas se anota como un cero, mientras el efecto de remolino se anota como un 5. A menudo es más prudente calificar al semen con movimiento rápido, aunque no ondulatorio, con 5 (Fayrer, 1996).

B) Motilidad Individual.

La motilidad individual se valora colocando una gota de semen sobre un portaobjetos tibio, y se observa al microscopio con objetivo de 40X [seco fuerte] (Allen, 1992; Fayrer, 1996; Corona, 2001).

Se calcula el porcentaje (hasta lo mas próximo al 10%) de los espermatozoides que nadan activamente, en líneas relativamente rectas a través del campo de visión (Allen, 1992), es decir , la proporción de motilidad progresiva lineal (Fayrer, 1996).

Los espermatozoides que nadan describiendo círculos presentan anomalías en la cola (Allen,1992; Fayrer, 1996) o que se mueven de lado a lado sin mostrar movimiento hacia delante no son normales (Birchard *et al.*, 1996). Se tomará nota del movimiento oscilatorio aunque no constituyen un buen síntoma (Allen,1992).

Los espermatozoides pueden verse agrupados unos con otros y con células epiteliales o macrófagos (Allen,1992) que puede deberse a aglutinación por *Brucella canis* o a anticuerpos denominados antiesperma (Ward, 2000), también, pueden verse células pequeñas redondas [eritrocitos o neutrófilos] para realizar su diferenciación puede ser necesario realizar una extensión hematológica (Allen,1992).

Allen (1992) ha observado una motilidad del 90 al 95 % en muchos perros fértiles y dice que una motilidad inferior al 80% de forma progresiva puede indicar un descenso de la fertilidad. Aunque England *et al.* (2000) establece un rango de 60 a 90% para la motilidad progresiva, mientras que Birchard *et al.* (1996) y Corona (2001) mencionan que la muestra de semen normal contiene más de 70% de los espermatozoides que se desplazan hacia delante (motilidad progresiva).

Si se observa una motilidad espermática pobre consistentemente, deben considerarse causas infecciosas y/o inflamatorias (Ward, 2000).

Calificación de la Motilidad Individual.

La motilidad individual también califica en una escala de 0 a 5. Una regla rígida del manejo de buena motilidad [4] le permite al operador determinar simplemente la forma de como atraviesa el campo de visión. Una motilidad extremadamente buena [5] es cuando la estructura de célula de esperma apenas perceptible atraviesa el campo de visión. El esperma normal debe

exhibir movimiento progresivo hacia adelante y debe marcar 2.5 a 5 o más de 5 (Fayrer, 1996).

Sólo los espermatozoides con motilidad IV tienen motilidad normal. Aunque se ha sugerido que una carencia de motilidad espermática es el mejor predictor de esterilidad actualmente, aunque todavía, no hay estudios suficientes para probar semejante relación. La mayoría de los perros fértiles tienen más del 70% de motilidad en la categoría 4 (England *et al.*, 2000).

Corona (2001) sugiere la siguiente escala para el puntaje de motilidad:

10. Movimiento progresivo máximo, con desplazamiento del espermatozoide en espiral.
9. Movimiento de la cabeza de lado a lado provocando movimiento espiral similar al puntaje 10.
8. Igual al 10 pero más lento.
7. Igual al 9 pero más lento.
6. Movimiento de pescado [se mueve de lado a lado sin movimiento progresivo].
5. Movimiento circular.
4. Igual al tipo 5 pero más lento.
3. El espermatozoide permanece en su lugar con movimientos rápidos de lado a lado con rotación en sentido de las manecillas del reloj.
2. Igual que el 3 pero más lento.
1. Movimiento de cola de lado a lado pero sin rotación (puede ser rápido o lento).

6.4.2.2. Concentración.

Fontbonne (1996) establece un promedio de concentración espermática de 500,000 células por mm^3 y Corona (2001) menciona un número de 200 a 1000 millones de espermatozoides por ml.

El número de espermatozoides en un eyaculado varía dependiendo en parte de la edad, peso testicular, actividad sexual y posiblemente la estación del año (Birchard *et al.*, 1996). England *et al.* (2000) dice que se ha demostrado una relación entre la raza del perro y el número de espermias eyaculadas y que las razas más grandes generalmente producen más esperma.

Se piensa que la fertilidad normal es posible cuando la cuenta espermática es mayor de 200 millones de espermatozoides normales vivos en un eyaculado (Birchard *et al.*, 1996; England *et al.*, 2000; Ward, 2000). Menos de 100×10^6 células del total han sido asociadas con infertilidad (Fayrer, 1996).

Cuando se lesionan los tubos seminíferos a consecuencia de enfermedad escrotal o testicular, la cuenta espermática puede reducirse durante un periodo que varía de semanas a meses (Birchard *et al.*, 1996).

Según Corona (2001) se puede hacer una estimación práctica de la concentración espermática del semen canino de la siguiente manera:

Estimación Cuantitativa Grosera.

- Se coloca 0.01 ml de esperma en un portaobjetos.
- Se coloca un cubreobjetos de 18 X 18 mm
- Se valora a partir de la distancia entre las cabezas:
 - < 200 mill = distancia 1/3 de la longitud;
 - 500 a 1000 = distancia = a la cabeza;
 - > 1000 = distancia de media cabeza.

Sin embargo para una estimación más precisa los espermatozoides se cuentan empleando un hemocitómetro (Birchard *et al.*, 1996; England *et al.*, 2000; Corona, 2001).

6.4.2.3. Porcentaje Vivo.

El porcentaje vivo de la población celular espermática puede determinarse con el nivel 40X contando 10 células espermáticas y determinando el número de células motiles. Este procedimiento se repite 4 a 5 veces y el promedio se toma. La motilidad y porcentaje vivo son consideraciones importantes cuando se calcula la dosis de la inseminación para la perra (Fayrer, 1996).

6.4.2.4. Morfología.

Los espermatozoides del perro miden alrededor de 62-66 nm. La cabeza es aplanada dorso ventralmente y mide de 4 a 5 nm. La parte intermedia mide entre 6 y 6,6 nm. El flagelo es el elemento propulsor del espermatozoide y está organizado alrededor de un filamento axial y mide aproximadamente 55 nm, actúa como una hélice haciéndole avanzar en los líquidos que lo contienen como plasma seminal o secreciones útero-vaginales (Fontbonne, 1996).

Fayrer (1996) dice que un eyaculado normal debe tener más de 80% de espermias normales morfológicamente; mientras que para England *et al.* (2000) una morfología normal se encuentra entre 70 a 90% y Ward (2000) menciona que un 75% es suficiente.

El mejor procedimiento para la determinación de la morfología espermática consiste en el empleo de una combinación relativamente simple de colorantes, nigrocina y eosina conocida como "tinción vital" (Allen, 1992; Fayrer, 1996; England *et al.*, 2000). La muestra deberá ser teñida tan pronto como sea posible después de su colección (Allen, 1992).

Allen (1992) describe la técnica para la tinción como sigue:

- Colocar varias gotas del colorante nigrocina y eosina en un tubo de ensayo y dejarlo calentar en el baño maría por 2 minutos.
- Añadir una gota de semen (tras realizar una mezcla, cuando los espermatozoides se han sedimentado).
- Inmediatamente, una pipeta limpia, colocar una gota de la mezcla colorante y semen sobre un portaobjetos limpio.
- Usando un segundo portaobjetos colocado en ángulo de 45° , realizar una extensión fina del material sobre el primer porta objetos, al igual que se hace en la preparación de una extensión hematológica.
- Dejar secar la extensión (esto suele ser bastante rápido).
- Observar el portaobjetos con objetivo 100X en inmersión; si los espermatozoides se encuentran en su totalidad unos sobre otros se realizara una segunda extensión usando un mayor volumen de colorante; si los espermatozoides son muy escasos, puede hacerse otra extensión usando menos colorante.
- Se examinan 100 espermatozoides y se clasifican como vivos y normales o, como muertos y anormales

La silueta de los espermatozoides aparecen en la extensión sobre un fondo negro por la nigrosina (Allen,1992).

La eosina es un tinte vital y se excluye de las células vivas con membranas del plasma ilesas por lo que los espermatozoides normales no se tiñen. En el caso de células con membranas dañadas las células se tiñen de rojo por penetración

de la eosina, que normalmente son células muertas o agonizantes (Allen, 1992; Fayrer, 1996; England *et al.*, 2000).

Pueden usarse procedimientos más complejos para teñir porciones específicas de los espermatozoides en estudios especializados (Allen, 1992).

La morfología de la célula espermática se subdivide en tres grupos. Células normales, anormales primarias y anormales secundarias (Allen, 1992; Fayrer, 1996; Corona, 2001).

Basándose en Allen (1992) y Corona (2001) puede hacerse la siguiente clasificación morfológica.

Anormalidades Primarias:

- a) Doble flagelo.
- b) Cola doblada.
- c) Microcéfalo.
- d) Macrocéfalo.
- e) Cabeza alargada.
- f) Cabeza redonda.
- g) Cabeza doble.
- h) Cabeza periforme.

Anormalidades Secundarias:

- a) Cabeza y cola sueltas.
- b) Anomalías de la cabeza.
 - Cubierta acrosomal separada [acrosomas desprendidos y edematosos].
 - Acrosomas protuberantes.

- Defecto de cráter.

c) Anomalías en el cuello.

- Cuello torcido.
- Cuello roto.
- Gota citoplasmática intermedia.

c) Anomalías en la pieza media.

- Gota citoplásmica distal.
- Unión al cuello [mitocondrias alteradas].

d) Anomalías en la cola.

- Cola torcida.
- Cola enrollada.

Allen (1992) interpreta las anomalías secundarias de la siguiente manera:

Anomalías del Acrosoma: El acrosoma resulta esencial para la fusión del espermatozoide con el óvulo; un desprendimiento o separación prematura del acrosoma puede indicar capacitación precoz [un proceso de maduración que suele producirse cuando el espermatozoide se encuentra en el tracto genital femenino y que debe tener lugar antes de que el espermatozoide pueda penetrar en el óvulo]. Generalmente, en el semen canino solamente se observa un pequeño número de acrosomas protuberantes; en otras especies, un número elevado de acrosomas protuberantes pueden originar esterilidad.

Defecto de cráter: indica probablemente que no se han formado correctamente las partes del DNA en la cabeza.

Anomalías en el cuello. En algunos perros la infertilidad es causada por la interrupción en la continuidad del cuello y la pieza media asociada con anomalías de las mitocondrias; en el cuello y a lo largo del resto de la pieza media se observan abultamientos irregulares [marcas].

La curvatura del cuello o separación de la cabeza pueden ser consecuencia de una manipulación brusca de la muestra; normalmente en una muestra única aparecen muy pocos espermatozoides con esta anomalía.

Las gotas citoplásmicas proximales son abultamientos lisos unilaterales en la pieza media proximal (cuello); son restos del citoplasma de la célula precursora del espermatozoide, la espermatida.

Los espermatozoos presentes en la cabeza del epidídimo poseen normalmente gotas proximales; tales espermatozoos no son capaces de realizar inmediatamente la fertilización; la presencia de gotas proximales indica probablemente un paso acelerado de los espermatozoos a través del epidídimo.

Anomalías en la pieza media: la gota citoplásmica distal que se localiza en el extremo distal de la pieza media y representan la emigración de la gotita proximal y es considerada normal.

Anomalías en la cola. Las formas anormales de la cola no permiten el movimiento progresivo del espermatozoide y pueden dificultar tanto su recorrido hacia la trompa de Falopio como su capacidad para penetrar en el óvulo.

La técnica de tinción puede influir sobre la morfología, por ejemplo algunos preparados de eosina y nigrocina pueden torcer la cola de los espermatozoides (Allen,1992).

Esta práctica es de valor cuestionable en otros animales domésticos, pero se ha mostrado en perros que cuando el porcentaje de esperma normal vivo declina por debajo del 60% hay, estadísticamente una reducción significativa en su fertilidad; esto no significa que los perros con valores más bajos son infértiles, o de fertilidad subóptima (England *et al.*, 2000); aunque hay informes de 87 a

92% de espermatozoides anormales (gotas citoplásmicas proximales) en perros fértiles (Fayrer, 1996).

Ward (2000) dice que la esterilidad del macho proviene típicamente de defectos primarios en las células espermáticas, es decir, de anomalías primarias que pueden ser el resultado de varios procesos de enfermedad.

6.4.2.5. Presencia de Otras Células.

Con el avance de la edad la incidencia de enfermedades inflamatorias prostáticas aumenta (Fayrer, 1996)

La presencia de células epiteliales, células rojas sanguíneas, células inflamatorias, y las células epiteliales germinales son identificadas bajo amplificación baja. Todas las células que no sean espermatozoides [cells other than sperm: COTS] son fáciles de ver si se hace una tinción con Wright, Giemsa o Diff Quick pero difícil de diferenciar usando tinciones comunes de morfología espermática (England *et al.*, 2000).

A) Leucocitos polimorfonucleares (neutrófilos) y macrófagos.

Pueden proceder de la próstata aunque es más corriente que sean contaminantes procedentes de la superficie del pene y de la mucosa interna del prepucio (Allen, 1992; England *et al.*, 2000); la mayoría de los perros se resisten a la limpieza del pene para eliminar esta película de células antes de la colecta. Los espermatozoides pueden verse con frecuencia adheridos a los macrófagos aunque en general la motilidad de la muestra no es afectada por los neutrófilos (Allen, 1992).

La enfermedad de la próstata puede afectar la fertilidad por qué la sangre puede influir en la debilidad del espermatozoide en algunos casos esto es improbable

en los perros; se desconoce el efecto de la infección prostática [excreción de neutrófilos] sobre la función de los espermatozoides; los fármacos usados para reducir el tamaño de la próstata [estrógenos y progestágenos] pueden inhibir también la espermatogénesis (Allen, 1992).

B) Eritrocitos.

Se observan corrientemente en los eyaculados de perros con edades superiores a los 5 años. Tienen origen indudablemente en la glándula próstata, y suelen aparecer sin que exista enfermedad clínica, incluso cuando aparece gran número, no suelen influir sobre la motilidad de los espermatozoides [no sucede así en otras especies] (Allen, 1992)

Grandes números de células inflamatorias, neoplásicas, o rojas pueden indicar enfermedad de la próstata. Estos cambios también pueden afectar al espermatozoide y reducir la fertilidad. El semen de un semental que no ha eyaculado recientemente puede contener restos de células epiteliales que el semen de un semental usado frecuentemente, pero si cantidades grandes de restos de espermatozoide muerto están presentes, una segunda muestra debe colectarse 24 horas después (England *et al.*, 2000).

Ward (2000) cree que existe una alta incidencia de esterilidad subclínica causada por enfermedad prostática crónica, por lo que se debe tener en cuenta en el diagnóstico de esterilidad en perros.

6.4.2.6. Microbiología.

El fragmento espermático y el fluido prostático pueden ser una fuente de bacterias. Esto puede ocasionar problemas reproductivos en la perra, desde vaginitis a piometra e infertilidad; las fracciones del espermatozoide y prostático deben teñirse con tinción de Wright. Aunque esta tinción toma mucho más

tiempo que Diff Quik, la diapositiva de tinción de Wright es diagnósticamente superior a Diff Quik. Se debe recordar que si la tinción de Wright se deja evaporar la tinción se sedimentara. Este sedimento puede diagnosticarse como una infección bacteriana por el observador inexperto. (Fayrer, 1996)

La flora bacteriana es normalmente mixta, se encuentran más de 10,000 bacterias por ml. Estas bacterias, incluso *Streptococcus spp* beta hemolítico, se considera actualmente como organismos comensales, sin embargo, la sólo presencia de muchas células blancas es una indicación para el cultivo bacteriano (England *et al.*, 2000).

Cultivo y Sensibilidad.

La inversión en el linaje genético de muchos perros de pura sangre es enorme, malgastar este recurso a través de infecciones venéreas es irresponsable (Fayrer, 1996).

La presencia de células blancas de la sangre, sobre todo algunas degeneradas, o células de sangre rojas, puede señalar infección y/o inflamación. Si la infección es sospechosa, deben realizarse los cultivos pertinentes (Ward, 2000).

Los cultivos deben obtenerse bajo las condiciones estériles óptimas (Fayrer, 1996)

El cultivo de la fracción de eyaculado rica en espermatozoides identifica a los microorganismos que se originan en testículos y próstata (Birchard *et al.*, 1996) y preferentemente debe estar libre de fluido prostático (Fayrer, 1996).

El cultivo de la fracción prostática es más específico para describir microorganismos provenientes de esta glándula (Birchard *et al.*, 1996), también debe examinarse citológicamente. La presencia de números grandes de

bacterias, o células de sangre rojas y blancas, pueden señalar infección y/o inflamación (Ward, 2000).

VII. PRESERVACIÓN DE SEMEN.

La preservación exitosa mediante refrigeración y congelación de espermatozoides es dependiente de una serie de pasos tendientes a reducir el daño a la célula y a asegurar una adecuada longevidad *in vitro* e *in vivo*, por ejemplo: una dilución óptima, suma de extensores. tipo de buffer, la proporción protectores de frío y crioprotectores, proporción de enfriamiento y tiempo de adaptación, siembra, proporción de congelado y descongelado, y posiblemente, también la remoción del crioprotector después de descongelar que podría depender del tiempo de almacenamiento *in vitro* antes de la inseminación y en el método de deposición de semen, vaginal o intrauterina (Farstad, 1996).

La base del semen refrigerado y el semen congelado es la conservación de energía dentro de la célula espermática para que el semen pueda enviarse o pueda usarse a una fecha posterior (Hutchison, 1999).

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 y en 1957 Harrop logra la primera gestación con semen refrigerado (Stornelli *et al.*, 2001a) y Seager en 1969 la primera con semen congelado (Farstad, 2000; Stornelli *et al.*, 2001a).

7.1. Efecto de la Preservación del Semen Canino a Bajas Temperaturas.

Según Rodríguez (2000) el espermatozoide es una célula terminal, cuyo rol principal es el transporte de un paquete, constituido por el genoma nuclear y el centríolo, hasta el ovocito. Para realizar esta tarea, el espermatozoide está

equipado con una batería de estructuras especializadas (una membrana plasmática que muestra áreas delimitadas, organelos con disposición específica tales como la vaina mitocondrial, y especializaciones de los mismos tales como el flagelo y el acrosoma) los que garantizan la interacción particular con el tracto genital femenino y el ovocito y sus envolturas. La viabilidad celular espermática decrece rápido y substancialmente luego de la eyaculación. La criopreservación, cuyo propósito es garantizar su supervivencia, ocasiona sin embargo daño irreversible a las membranas plasmáticas causando ya sea la muerte celular o cambios parecidos a los que se ven durante la capacitación espermática,

El daño al espermatozoide por enfriamiento de su temperatura fisiológica al punto de congelación es llamado choque por frío (Farstad, 1996).

El refrigerado y congelado de espermatozoides pueden provocar alteraciones físicas y químicas a la membrana celular y pueden ser irreversibles; estos efectos o alteraciones pueden ser inmediatos y retardados en su estructura. Los efectos inmediatos del refrigerado pueden matar espermatozoides o pueden dañar al acrosoma e incapacitarlos para la fertilización, considerando que los efectos retardados como disminución en la fluidez de la membrana, incremento de la permeabilidad de la membrana, deshidratación, liberación de encimas y fosfolípidos, reducción de la actividad metabólica y consumo disminuido de ATP, pueden reducir la longevidad del esperma alterando la estructura de la membrana plasmática comprometiendo parcial o totalmente la fertilidad o capacidad para interactuar con el ovocito durante la fertilización (Brown, 1992; Farstad, 1996; Hutchison, 1999; Rodríguez, 2000; Burgess *et al.*, 2001; Foster *et al.*, 2001).

La habilidad de los espermatozoides de permanecer refrigerados o congelados difiere entre las especies. Los espermatozoides de caballo, gato, perro y humano son relativamente insensibles al choque por frío, sin embargo, los

espermatozoides de ganado, borregos y cabras muestran sensibilidad media, y el espermatozoide de cerdo es extremadamente sensible (Farstad, 1996).

7.2. Adición de Extensores.

Los extensores diluyen el semen y sustituyen al fluido prostático y le proporcionan un medio osmótico favorable, tanto como proveer de energía durante el periodo de almacenado, enfriamiento, adaptación y congelación, un ambiente que proteja a los espermatozoides contra la disminución de temperatura, sustancias buffer que protejan el semen contra cambios extremos de pH, y antibióticos que inhiban el crecimiento bacteriano (Brown, 1992; Farstad, 1996; England *et al.*, 2000; Goodman, 2000; Davol, 2001; Evans, 2001; Linde, 2001b) en especial en los que contienen yema de huevo (Stornelli *et al.*, 2001a).

La suma de extensores de semen no parece producir cambios estructurales significativos en los espermatozoides (Burgess *et al.*, 2001).

7.2.1. Protectores de Frío y Crioprotectores.

La adición de protectores al frío como la yema de huevo y crioprotectores como el glicerol y el DMSO (dimetilsulfoxido), los azúcares como lactosa y sucrosa, polímeros macromoleculares o detergentes como la polivinil pirrolidona, orvus ES-Paste protegen al espermatozoide durante el proceso de enfriamiento, congelación y descongelación (Farstad, 1996).

La yema de huevo contiene fosfatidilcolina que al igual que los fosfolípidos de la leche ayudan a la restauración de la membrana espermática por pérdida de fosfolípidos durante el enfriamiento (Farstad, 1996; Evans, 2001).

El glicerol es el crioprotector más usado para la congelación de espermatozoides de animales domésticos (Farstad, 1996), limita el grado de formación de cristales durante la congelación (Evans, 2001) sin embargo se ha demostrado que es tóxico para los espermatozoides pues envuelve la membrana y altera la osmolaridad del extensor (Farstad, 1996).

7.3. Semen Fresco.

Se ha estimado que el semen fresco sobrevive durante cuatro a seis días dentro de la perra (Martin, 1996; Hutchison, 1999)

Según England *et al.* (2000) el semen fresco puede preservarse durante tres o cuatro horas dejándolo enfriar a temperatura ambiente si no es usado inmediatamente poscolección para la inseminación artificial. Para periodo más largos, debe diluirse y refrigerarse.

7.4. Semen Refrigerado.

El semen refrigerado puede retener su motilidad e integridad de la membrana durante por lo menos 4 días (Rota *et al.*, 1995), y probablemente más, aunque todavía no se ha determinado por cuánto tiempo puede retener su capacidad fertilizadora (Linde, 2001b).

7.4.1. Extensores para Semen Refrigerado.

La refrigeración de semen a 4° C permite, gracias a la adición de extensores, conservar espermatozoides con capacidad fecundante por periodos de tiempo cortos pero suficientes para el traslado y utilizar el semen de un reproductor en lugares distantes al de su hábitat. Este método de conservación seminal es sencillo y poco costoso y puede ser aplicado en la práctica reproductiva diaria mejorando las posibilidades de uso del semen de un reproductor. Las bajas

temperaturas disminuyen las tasas metabólicas del espermatozoide y prolongan su longevidad (Stornelli *et al.*, 2001a; 2001b).

Un extensor simple y eficaz para el refrigerado y envío de semen es la leche descremada calentada a aproximadamente 95° C durante diez minutos en una olla doble. Se enfría entonces a 37° C para usarse. El paso calorífico desnaturaliza un componente espermicida de la albúmina de la leche (England *et al.*, 2000).

Varios extensores para refrigeración de semen están disponibles, algunos patentados como CLONE Chilled System (Cryogenetic Laboratories Of New England) y Synbiotics Fresh Express. Uno comúnmente usado sin patente es el extensor TRIS-Yema de huevo [Tabla 1] (Linde, 2001b) y otros compuestos con yema de huevo y crema o leche descremada (Stornelli *et al.*, 2001a). También pueden usarse extensores Comerciales usados para transporte de semen equino; por ejemplo Kenney o "E Z mixín" (Minitub) pero no existen datos que demuestren que estos extensores sean superiores a los otros (England *et al.*, 2000).

Extensor Tris-Yema de Huevo para Refrigeración de Semen canino

| | |
|---------------------------------|----------|
| Tris (hidroximetil) aminomatano | 3.025 g |
| Ácido cítrico | 1.7 g |
| Fructosa | 1.25 g |
| Agua destilada | A 100 ml |
| Yema de huevo | 20 ml |
| Bencil penicilina | 1 mg/ml |
| Sulfato de dihidroestreptomina | 1 mg/ml |

Tabla 1. Puede prepararse en laboratorio. Si el extensor se prepara sin yema de huevo, puede ser almacenado en pequeñas porciones en un congelador ordinario, se adiciona el 20% de yema de huevo al momento de usarse. Si se congela con yema de huevo puede tener una caducidad de 2 a 3 meses aproximadamente.

Rota (1995) comparó la supervivencia del semen diluidos con Tris-Yema de huevo, no diluido y diluido con plasma seminal a 4° C observando la

supervivencia con altos porcentajes de motilidad con semen diluido con Tris-Yema de huevo y rápida pérdida de la viabilidad en el semen no diluido o diluido en el plasma seminal.

Iguer *et al.* (2001) encontró que la adición de yema de huevo tiene un efecto benéfico sobre la motilidad espermática y un efecto protector que reduce las reacciones del acrosoma en el semen refrigerado. Los resultados de su investigación indicaron que la buena calidad de espermatozoides de perro podrían conservarse por más de 10 días; como el Byladil adicionado con yema de huevo que produjo un porcentaje de motilidad espermática de 86.3 ± 10.5 después de 7 días a 4°C y el Tris-glucosa suplementado con yema de huevo, puede preservar la motilidad e integridad del acrosoma en semen refrigerado por 13 ± 1 día con un rango de 50% de conservación de motilidad espermática.

Otro estudio demostró que se han logrado buenos resultados *in vitro* almacenando y conservando semen canino diluido en MR-A® [Kubus SA, España] yema de huevo a 4 y 15°C (Stornelli *et al.*, 2001a; 2001b; 2002), permitiendo obtener porcentajes altos de motilidad individual, acrosomas intactos, endosmosis positiva [% de colas enrolladas] de semen refrigerado durante tres días, por lo que podría ser usado para IA 72 horas pos refrigeración con buenos resultados (Stornelli *et al.*, 2001b; 2002).

7.4.2. Preparación de Semen.

Para la refrigeración se colecta la fracción espermática (Goodman, 2000; Linde, 2001b; Stornelli *et al.*, 2001a) y se evalúa el número total de espermatozoides, morfología y motilidad, se centrifuga a $300 - 700\text{ G}$ por 5 a 6 min. El sobrenadante de plasma seminal [qué es perjudicial a los espermatozoides durante el almacenamiento] se desecha, 2 a 5 ml de extensor se adiciona [a la misma temperatura del semen] al pellet y se mezcla perfectamente (Linde, 2001b).

Entre semen y diluyente debe respetarse una relación 1:3 o 1:4, una proporción excesiva de diluyente tendrá influencias negativas sobre la motilidad (Stornelli *et al.*, 2001a)

Usando grandes volúmenes para IA sólo llevarán a la pérdida de espermatozoides debido al reflujo de semen del útero o de la vagina. El semen se enfría entonces a 5° C por más de 30 a 45 min, o se pone a enfriar durante el transporte en una caja de styrofoam con un paquete de hielo [ice-pack] (Linde, 2001b). Un Equitainer (Hamilton Thorne) enfría el semen a 0.3° C/minuto manteniendo mejor motilidad que otros rangos de refrigeración y funciona muy bien al refrigerar semen, además, tiene el mejor aislamiento del mercado, una buena consideración cuando el semen será transportado a través de variaciones de temperatura (England *et al.*, 2000), en su ausencia, puede transportarse también semen refrigerado en un frasco térmico pequeño que contenga hielo molido (Linde, 2001b).

Verifique una gota recalentada de semen examinar su vitalidad pos refrigeración, antes de poner la muestra en el frasco o caja. El semen de calidad original se preserva de esta forma y es almacenado en refrigeración se ha usado con éxito después de 2 a 4 días, y probablemente puede usarse considerablemente por más tiempo. Se marca el vial de semen con la raza del perro, nombre de registro, número de registro, y fecha y lugar de colección. Siempre que sea prácticamente posible un sello numerado debe aplicarse al termo o a la caja de styrofoam. Esto es requerido por algunos países, y les impide a las personas no autorizadas a abrir el paquete interno que contiene el semen. El número debe declararse en el certificado veterinario (Linde, 2001b).

England *et al.* (2000) menciona que el semen se deteriora cada día que se guarda y después de dos o tres días, su fertilidad es aproximadamente igual que la del semen congelado.

Previo a la IA el semen refrigerado debe alcanzar lentamente la temperatura a temperatura corporal y su calidad es reevaluada. El semen puede inseminarse entonces (England *et al.*, 2000; Stornelli *et al.*, 2001a).

En muchos casos, el semen parecerá no tener motilidad. Sin embargo, cuando la gota de semen se calienta gradualmente aparecerá la motilidad. El calentamiento continuo muestra las células logrando una progresión normal hacia adelante. Si ninguna motilidad se alcanza pasados quince minutos, la muestra probablemente no sea viable. Si esto ocurre debe avisarse al colector del semen para determinar, de ser posible, la causa de la muerte del semen. En otros casos donde la recuperación de semen es parcialmente recobrada, los inseminadores deben usar un juicio basado en la conexión del semen, el número de espermatozoides totales estimados y el porcentaje de recuperación. También puede ser necesario alterar el método de la inseminación a una deposición intrauterina del esperma refrigerado para contrarrestar el estrés de la célula espermática y para ayudar a su llegada a los tubos de Falopio (Hutchison, 1999).

7.4.3. Material de Empaquetado de Semen Refrigerado.

Deben usarse tubos de plástico estéril para el semen, por ejemplo tubos Nunc (Nalge Nunc International) que no se rompen durante transporte. El semen enfriado normalmente se envía en un termo ordinario o una caja de styrofoam. Es indispensable que la temperatura no descienda por debajo de 0°C para asegurar que el semen no se congele (Linde, 2001b). La congelación mata las células espermáticas de la muestra inutilizándola (Hutchison, 1999). Por consiguiente, el tubo que contiene el semen debe protegerse del contacto directo con los cubos de hielo o paquete, por ejemplo, envolviéndolo en un pedazo de lana de algodón o periódico (Linde, 2001b).

El termo y las cajas de styrofoam pesan poco y normalmente debe ser no retornables, esto mantiene los costos de envío bajos (Linde, 2001b).

7.4.4. Vitalidad *In Utero*.

El semen enviado refrigerado tiene un tiempo de supervivencia inconstante; el estrés de la refrigeración, envío y recalentado reduce el lapso de vida de las células espermáticas de aproximadamente 5-7 días a solo 24 a 72 horas *in utero* y en promedio 48 horas (Hutchison, 1999; Goodman, 2000; Evans, 2001) esto hace necesaria una manera más precisa para determinar el momento de la ovulación y momento óptimo de IA (Hutchison, 1999; Goodman, 2000).

7.4.5. Resultados del Uso de Semen Refrigerado.

Un informe del porcentaje de pariciones de 374 inseminaciones artificiales usando semen refrigerado se reporto un 45.1% con deposición vaginal craneal del semen y un 65.6% para la deposición transcervical intrauterina. El tamaño promedio de la camada fue de 5.8 ± 3.0 cachorros para inseminaciones vaginales y 6.4 ± 3.2 para inseminación intrauterina. Los resultados de este estudio enfatizan la importancia de la deposición intrauterina de semen no sólo para semen congelado, sino también al usar semen refrigerado (Linde, 1999; 2000; 2001).

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 % y de 51.1 % con yema de huevo/crema (Stornelli *et al.*, 2001a).

7.5. Semen Congelado.

Desde que la primera descripción de Harrop en 1960, la criopreservación de semen canino se ha desarrollado y refinado considerablemente (Farstad, 2000),

obteniendo la primera camada mediante inseminación artificial con semen congelado en USA por Seager en 1969 (Farstad, 2000; Stornelli *et al.*, 2001a).

Al contrario del semen refrigerado, el semen congelado permite al potencial genético de un perro ser conservado para el uso futuro, en caso de enfermedad, muerte, esterilidad inesperada o venta del perro. También el semen congelado facilita la reproducción a largas distancias internacionales, y es útil cuando el macho no está disponible durante los periodos fértiles de la perra (Martin, 1996; Goodman, 2000; Greenbank *et al.*, 2000).

El semen canino congelado puede guardarse prácticamente por tiempo indefinido (England *et al.*, 2000; Linde, 2001b). Cuando se procesa, congela, y guarda apropiadamente el semen canino durará un tiempo estimado de 10,000 o más años en nitrógeno líquido (Hutchison, 1999; Goodman, 2000).

Puede congelarse en pajillas francesas de 0.5 o minipajillas de 0.25 ml almacenadas en nitrógeno líquido a -196° C o en pastillas (pellets) de igual volumen a las pajillas, que pueden guardarse en hielo seco. Las pajillas de 0.5 ml son preferidas por la mayoría de las agencias de semen congelado y por practicantes que realizan IA (Martin, 1996; Hutchison, 1999; Greenbank *et al.*, 2000; Linde, 2001b; Stornelli *et al.*, 2001a).

Según Greenbanck *et al.* (2000) las pastillas pos descongelación pueden alcanzar una motilidad progresiva del 70% o más comparado con el de las pajillas que es de 40 al 60%.

Controles periódicos del termo de almacenamiento que aseguren un volumen de nitrógeno que permita una buena conservación del semen y una reducida exposición del mismo a temperatura ambiente fuera del nitrógeno durante el manejo de pajuelas o pastillas permitirá conservarlo en buenas condiciones para su posterior uso (Stornelli *et al.*, 2001a; Linde, 2001b).

7.5.1. Extensores para semen congelado.

El término almacenamiento largo de semen requiere dilución con un extensor que contiene un crioprotector y almacenamiento en nitrógeno líquido. (Daval, 2001)

Hay varios establecimientos o agencias que congelan semen de perro y usan extensores patentados, como por ejemplo Canine Cryobank, CLONE, International Canine Semen Bank (ICSB), y Synbiotics. Otros usan Triladyl (Minitüb, Tiefenbach, Alemania) o sistemas no patentados como el extensor de Uppsala-Equex (Rota *et al.*, 1995), y su modificación el extensor Uppsala-Equex 2 [Tabla 2](Linde, 2001b).

Extensores Uppsala para Congelación de Semen canino

| Ingredientes | Uppsala Equex Sistem | | | Uppsala Equex Sistem 2 | | |
|------------------------------|-------------------------------------|------------|-----------------|------------------------|------------|-----------------|
| | Extensor 1 | Extensor 2 | MD ¹ | Extensor 1 | Extensor 2 | MD ¹ |
| Tris | 2.4 g | Ditto | Ditto | 3.025 g | Ditto | Ditto |
| Acido citrico | 1.4 g | Ditto | Ditto | 1.7 g | Ditto | Ditto |
| Glucosa | 0.8 g | Ditto | Ditto | 1.25 g | Ditto | Ditto |
| Estreptomicina | 0.1 g | Ditto | Ditto | 0.1 g | Ditto | Ditto |
| Agua destilada | A 77 ml | A 72 ml | A 100 ml | A 77 ml | A 72 ml | A 100 ml |
| Bencil penicilina | 0.06 g en 0.3 ml de AD ² | Ditto | Ditto | Ditto | Ditto | Ditto |
| Glicerol | 3 ml | 7 ml | None | 3 ml | 7 ml | None |
| Equex STM Paste ³ | None | 1 ml | None | None | 1 ml | None |
| Yema de huevo | 20 ml | Ditto | None | 20 ml | Ditto | None |
| PH | 6.53 | 6.48 | 6.60 | 6.72 | 6.74 | 8.76 |
| Osmolaridad | 740 mOsm | 1370 mOsm | 253 mOsm | 865 mOsm | 1495 mOsm | 324 mOsm |

MD¹: Medio de descongelación

AD²: Agua destilada

Equex STM Paste³, es producida por Nova Chemical Sales Inc., Scituate, MA, USA. Es diferente de Equex Paste producida por Minitüb.

7.5.2. Preparación de Semen congelado.

El semen es colectado y centrifugado como se describió anteriormente para la preparación de semen refrigerado (Linde, 2001b).

Se han descrito muchos procedimientos para congelar semen canino (England *et al.*, 2000). También pueden usarse varios extensores a un paso o a dos pasos (el primero a la temperatura del cuarto y el segundo después de refrigerar y simplemente antes de congelar), se equilibra durante 1 a 4 horas y se congela, en vapor de nitrógeno líquido en una percha a 4 cm sobre la superficie de LN2 en una caja del styrofoam (Peña *et al.*, 2001) o en tres pasos directamente en un tanque de nitrógeno líquido (Linde *et al.*, 1999; Peña *et al.*, 2000a; 2000b)

La Mayoría de las agencias congelan el semen a una concentración final de 50 a 100 millones de espermatozoos por ml en pajillas de 0.5 ml, y se usan 2 a 4 pajillas por IA. Algunos usan un medio de descongelación, normalmente 0.5 a 1 ml para cada pajilla o 1 a 2 ml por vial de pellet. O se descongela en un baño de agua a 37° C por 15 a 60 seg o a 70° C por 8 seg. Es importante adherir las instrucciones de descongelado proporcionadas por la agencia de congelación, ya que el método de descongelado es dependiente del método de congelado (Linde, 2001b).

7.5.3. Procedimiento Básico de Congelación.

England *et al.* (2000) dice que pueden usarse diferentes métodos de congelación, sin embargo ninguno funciona igual en cada perro. No obstante, describe el siguiente proceso básico que puede usarse:

Primero se diluye semen a temperatura de cuarto con un extensor que contenga Tris buffer (6.06 g) fructosa (2.5 g) ácido cítrico (3.4 g) y agua

deionizada q.s. a 184 ml. A esto, se agregan glicerol y yema de huevo a una concentración final de 8% y 20% respectivamente. La penicilina y estreptomycin frecuentemente se usan para prevenir crecimiento bacteriano mientras el semen está sufriendo el proceso de enfriamiento y descongelado.

No se requieren antibióticos a -196 grados C, la temperatura de nitrógeno líquido.

El semen diluido se enfría lentamente a 5 grados C, permitiendo equilibrarse por cuatro horas, y está entonces se congela, la mayoría normalmente en pajillas de 0.5 ml.

Para congelación práctica, se colocan las pajillas en un cesto de alambre cuatro cm encima del nivel del nitrógeno líquido. Se sostienen entonces en el vapor durante 5 minutos después se bajan al nitrógeno líquido y después de unos minutos, se transfieren con fórceps a los bastones usados en las unidades del almacenamiento de los contenedores de nitrógeno líquido.

7.5.4. Procedimiento de Congelación de Uppsala.

Linde (2001) y Peña (2001) describen el siguiente proceso de congelación desarrollado en la Universidad Sueca de Ciencias Agrícolas de Uppsala, Suecia.

El fragmento espermático del eyaculo es colectado. Después de evaluar morfología y motilidad y contar el número total de espermatozoides, el eyaculado se centrifuga a 700 G por 6 min. El sobrenadante se desecha (si todavía contiene espermatozoides se puede centrifugar nuevamente) y los pellets se diluyen a temperatura del cuarto en el extensor 1 ó 2 del Uppsala Equex Sistem a una concentración de 400×10^6 espermatozoides/ml y se equilibran por 60 a 75 minutos a 4° C, también un volumen igual de extensor

Uppsala 1 o 2 enfría a 4° C y se agrega después del periodo de adaptación, inmediatamente antes de llenar las pajillas de 0.5-ml, produciendo una concentración final de 200×10^6 espermatozoides/ml.

Las pajillas se congelan en vapor de LN2 en un tanque de LN2 Apolo SX-18 o un TW-10 XT o similar (Minnesota Valley Engineering, Inc., New Prague, MN, o Taylor-Wharton, Theodore, AL, USA) que contenga 15 a 18 ml de LN2. La congelación se realiza en tres pasos, con las copas a la cima de los bastones y por encima de los bastones 7, 13 y 20 cm (por 2, 2 y 1 min) debajo de la apertura del tanque, respectivamente, después la canastilla se sumerge en el LN2. No más de 4 pajillas deben ponerse en cada copa, y no más de 4 copas (es decir un total de 16 pajillas) deben congelarse en cada lote. Las pajillas también pueden congelarse usando una caja de styrofoam que contenga LN2 en la cual las pajillas quedan horizontalmente en una percha colocada 4 cm sobre la superficie de los LN2 por 10 min, después las pajillas se sumergen en el LN2.

El semen se congela normalmente para que el número final de espermatozoides por pajilla sea de entre 100 y 200×10^6 . Normalmente dependiendo de la calidad de semen 2 a 3 pajillas se usan para cada IA. En razas más pequeñas que producen menos espermatozoides por eyaculado puede ser deseable congelar un semen menos concentrado para obtener más pajillas.

7.5.5. Descongelado de las Pajillas.

Las proporciones de descongelado son importantes para la supervivencia de la célula, y frecuentemente se descongelan pajillas de semen a proporciones específicas sumergidas en un baño de agua a temperatura definida por la persona que congeló el semen (Hutchison, 1999; England *et al.*, 2000).

En ausencia de sugerencias de descongelado específicas, el semen debe descongelarse en agua a temperatura corporal durante por lo menos 20 segundos. Debe usarse entonces lo más pronto posible. El proceso de congelado descongelado causa una disminución considerable en la morfología del espermatozoide, motilidad y longevidad (England *et al.*, 2000).

Las pajillas se descongelan mejor en un baño de agua a 70° C por 8 seg (Linde, 2001b; Peña, 2001). Si resulta impráctico también pueden descongelarse a 37° C por 30 a 60 seg (Stornelli *et al.*, 2001a; Linde, 2001b). Cualquier remanente de agua por fuera de la pajilla se limpia cuidadosamente antes de abrirla. Cada pajilla se vacía en 0.5 a 1 ml del medio de descongelación Uppsala Equex 1 ó 2 a 37° C y se deja a esta temperatura durante aproximadamente 5 minutos antes de evaluar calidad del semen y realizar la IA. Esto en relación al método de Uppsala (Linde, 2001b). Se una supervivencia espermática más alta y longevidad cuando se adiciona Equex (Peña *et al.*, 2001).

Mientras que las minipajillas (0,25 ml) deben descongelarse a 75° C durante 5 segundos y las pastillas se descongelan a 37 °C utilizando usualmente solución salina de cloruro o citrato de sodio como diluyente (Stornelli *et al.*, 2001a).

7.5.6. Envío de Semen congelado.

Para enviar semen congelado se requiere un recipiente de nitrógeno líquido. El recipiente debe mantener la temperatura a alrededor de -197° C (Linde, 2001b).

Actualmente la mayoría de los establecimientos de semen congelado usan los llamados dry-shippers [cargadores secos] que absorben el nitrógeno líquido en un material poroso en sus paredes. Éstos no derramarán y por consiguiente necesitarán no ser enviados como material peligroso que es más caro. Sin

embargo, siempre deben ser enviados como material frágil, porque se rompen fácilmente por manejo rudo (Greenbank *et al.*, 2000; Linde, 2001b).

El tanque normalmente se envía en una caja de plástico para su protección, están disponibles en presentaciones diferentes, y parece que los de forma hongo ofrecen mejor protección, porque su forma los previene de ladearse y de que algo sea colocado encima de ellos durante el transporte. Algunos establecimientos de procesamiento demandan que el contenedor sea asegurado contra daños durante la carga. El código del envío para la declaración de nitrógeno líquido es: UN1977 el cual se informa en el estatus de "material restringido". las regulaciones que pertenecen específicamente a los cargadores secos se encuentran en *IATA Packing Instruction 202 Note* que se lee: "Paquetes aislados que contienen nitrógeno líquido refrigerado totalmente absorbido en un material poroso y planeados para el transporte, a temperatura baja, de productos no-peligrosos no están sujetos a estas Regulaciones" (Linde, 2001b).

7.5.7. Vitalidad *In Utero*.

Aunque el semen congelado puede descongelarse cuando se requiera, la fertilidad casi siempre es baja, y los costos asociados son altos (England *et al.*, 2000).

La criopreservación disminuye las habilidades naturales de los espermatozoides, estos sólo sobrevivirán por 12-24 horas una vez dentro de la perra (Martin, 1996; Hutchison, 1999). Este es notablemente un periodo más corto de tiempo comparado con semen fresco que se ha estimado sobrevive durante cuatro a seis días dentro de la perra (Martin, 1996)

Este lapso de vida extremadamente corto tiene éxito sólo con la determinación del tiempo optimo de inseminación, que requiere un trazo preciso del ciclo

estral de la perra con detección definitiva de la descarga de LH y el tiempo subsecuente de ovulación (Hutchison, 1999).

7.5.8. Resultados del uso de Semen congelado.

Se reportaron 84% de pariciones de 327 inseminaciones con semen congelado (Linde *et al.*, 1999) y 71% de 312 inseminaciones (Thomassen *et al.*, 2001) con deposición uterina usando un catéter escandinavo (Linde *et al.*, 2001a). En un estudio de campo de 10 años que incluyó 286 inseminaciones con semen congelado de calidad variable procesado por diferentes agencias a nivel internacional, realizadas en perras con fertilidad variable por muchos veterinarios diferentes la proporción de parición fue de 35% en inseminación vaginal comparada con un 52% en inseminaciones uterinas (Linde, 2000).

El estudio reportado por Linde *et al.* en 1999, demostró que usando un buen método para la criopreservación, junto con la IA intrauterina no quirúrgica empleando el catéter noruego, puede rendir proporciones de pariciones y tamaños de camada similares a aquellos reportados de cruza naturales bien controladas, y que la deposición intrauterina de semen congelado produce un porcentaje de pariciones significativamente más alta y tamaño de camada más grandes que la deposición vaginal.

Farstad (1996; 2000) reporta tasas de concepción del 67 al 80% con deposición intrauterina no quirúrgica de semen con 50 a 150 millones de espermatozoides por inseminación, con 2 inseminaciones a intervalo de 24 horas.

Martin (1996) dijo que muchos de los establecimientos que usan semen en pastillas están informando un 80-90% concepción en inseminaciones vaginales.

7.6. Identificación de Frascos o Pajillas de Semen.

Greenbank *et al.* (2000) y Linde (2001) sugieren que los frascos y pajillas deben ser etiquetados para su identificación con la información siguiente:

- Raza [qué puede abreviarse],
- Nombre de registro del perro [qué puede abreviarse],
- Número de registro del perro,
- Fecha de colección de semen [obligatorio cuando se requieren pruebas de sangre y certificados veterinarios], y
- Establecimiento donde fue colectado y procesado el semen.

REFERENCIAS.

1. Adams DR. Anatomía canina. Estudio sistémico. Zaragoza (España): Acribia; 1988.
2. Allen E. Fertility and obstetrics in the dog. Oxford (England): Blackwell Scientific publications Limited; 1992.
3. Birchard SJ & Sherding RG. Manual Clínico de Pequeñas Especies. Vol. 2; DF (México): McGraw-Hill, 1996: 1044-45
4. Brown RM. An update of artificial insemination with fresh, chilled, and frozen semen. *Probl Vet Med* 1992 Sep;4(3):445-52
5. Burgess CM, Bredl JC, Plummer JM, England GC. Vital and ultrastructural changes in dog spermatozoa during cryopreservation. *J Reprod Fertil Suppl* 2001;57:357-63
6. Corona CG. 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, Coah. México; 2001.
7. Cunningham JG. Fisiología Veterinaria. 2da ed. DF (México): McGraw-Hill Interamericana; 1999.
8. Davol PA. Canine Reproduction. Reproduction and the Male Dog. Part 4. 2001. Available in: URL: <http://www.labbies.com/reproduction4.htm>
9. England G & Lofstedt R. Canine Reproduction Seminar. Canada: Atlantic Veterinary College 2000 Sep: 8-13, 15-23
10. Esquivel LC y Páramo RM. Reproducción. Zootecnia: Diplomado a Distancia en medicina, Cirugía y Zootecnia en Perros y Gatos. 4ta ed. Mód. 11. DF (México): UNAM; 2001. p. 225-306.
11. Evans LE. Uses of frozen semen in the dog. In: Nebraska Veterinary and Biomedical Science Newsletter, University of Nebraska 2001 May; 30(5):6
12. Farstad W. Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology* 2000 Jan 1;53(1):175-86
13. Farstad W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Animal Reproduction Science* 1996;42:251-60
14. Fayrer HF. Canine Theriogenology Notes (Male). IAM 1996. Available from: URL:

15. Fontbonne A. Recolección y examen del semen del perro. En: Jornadas sobre manejo de la reproducción canina; 1996; Facultad de Veterinaria. Madrid, España; 1996. disponible en: URL: <http://www.redvya.com/veterinarios/veterinarios/especialidades/Reproduccion/Perros-gatos/Especialista/Articulo01.htm>
16. Foster R & Smith M. Artificial Insemination (AI). PetEducation.com.; 2001. Available from: URL: <http://www.peteducation.com/repro/AI.htm>
17. García PJ. Manual de Endocrinología Veterinaria. D.F. (México): UNAM; 1988.
18. Goodman M. Advantages and Disadvantages of Using Fresh-Chilled or Frozen Semen. In: 30th Annual Canine Symposium; 2000 Jan 29; University of Pennsylvania: Bellwether summer 2000; 47. . Available in: URL: <http://www.vet.upenn.edu/comm/publications/bellwether/47/canine-symposium.html>
19. Greenbank A & Goodman M. Sex and the single dog. Dogs in Canada; Ontario (Canada): Apex Publishing Limited; 2000-2001. Available in: URL: <http://www.dogs-in-canada.com/features/features/sexsingle.html>
20. Hutchison RV. Maximizing Conception Rates Using Fresh, Cooled, or Frozen Canine Semen. In: Canine Health Conference; 1999. AKC Canine Health Foundation; National Parent Club, Ohio (USA): Spinone Club of America 1997-2001. Available from: URL: http://www.spinone.com/AKC_CHF99/24Semen.htm
21. Iguer OM & Verstegen JP. Long-term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. Theriogenology 2001 Jan 15;55(2):671-84
22. Kojima E, Tsuruga H, Komatsu T, Murase T, Tsubota T & Kita I. Characterization of semen collected from beagles and captive Japanese black bears (*Ursus thibetanus japonicus*). Theriogenology 2001 Feb 1;55(3):717-31
23. Linde FC, Strom Holst B & Govette G. Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: a retrospective study. Theriogenology 1999 Jul 1;52(1):11-23
24. Linde FC. Fertility data from 2041 controlled artificial inseminations in the dog. In: Proceedings of the 4th International Symposium on Canine and Feline Reproduction, Oslo, 2000; 120

25. Linde FC. Intra-uterine insemination in the dog using the Scandinavian trans-cervical catheter and a comparison with other methods. In: Recent Advances in Small Animal Reproduction, Concannon PWC, England GCW and Verstegen J (Eds). Ithaca: International Veterinary Information Service 2001a; A1207.0201
26. Linde FC. Regulations and Recommendations for International Shipment of Chilled and Frozen Canine Semen. In: Recent Advances in Small Animal Reproduction, Concannon PW, England G and Verstegen J (Eds.) Ithaca: International Veterinary Information Service, 2001b; A1209.0501
27. Martin DJ. Frozen Semen: What you have always wanted to know about frozen canine semen, but were afraid to ask. The Labrador Retriever Annual, Hoflin Publishing Ltd. 1996. Available from: URL: <http://members.aol.com/spermdvm/QandA3.html>
28. Peña A & Linde FC. Effects of Equex, one- or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. Theriogenology 2000a Oct 1;54(6):859-75
29. Peña A & Linde FC. Effects of spermatozoal concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. Theriogenology 2000b Sep 15;54(5):703-18
30. Rodriguez MH. Evaluación del Semen Congelado: Métodos Tradicionales y de Actualidad. In: Topics in Bull Fertility, Chenoweth PJ (Ed.). Ithaca: International Veterinary Information Service 2000; A0502.0600.ES
31. Rota A, Ström B and Linde-Forsberg C. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4° C. Theriogenology 1995; 44(6):885-900
32. Sirivaidyapong S, Ursem P, Bevers MM & Colenbrander B. Effect of prostatic fluid on motility, viability and acrosome integrity of chilled and frozen-thawed dog spermatozoa. J Reprod Fertil Suppl 2001;57:383-6
33. Sisson S, Grossman JD y Getty R. Anatomía de los animales domésticos. 5ª edición, tomo II. DF (México): Salvat; 1993.
34. Stornelli MA, Stornelli MC, Arauz MS, Sauvignone CA, García M y De La Sota L. Effects of two different temperatures and three different extenders on survival and longevity of chilled canine semen. In: Wheeler MB & Smith L (Eds). Proceedings Annual Conference of the International Embryo Transfer Society. THGNBO 2002a; 57(1): 423

35. Stornelli MA y Stornelli MC. Evaluación de Semen e inseminación artificial con Semen Fresco y Criopreservado en el Gato Doméstico. La Plata, Argentina: Revista de la Sociedad de Medicina Felina (En Prensa) 2002b
36. Stornelli MA, Stornelli MC, Arauz MS y De La Sota L. Inseminación Artificial con Semen Fresco, Refrigerado y Congelado. Aplicación y Desarrollo en Caninos. La Plata, Argentina: Analecta Veterinaria 2001a; 21 (1): 58 -66
37. Stornelli MA, Stornelli MC, Arauz MS, Sauvignone CA, García M y De La Sota L. Estudio comparativo del efecto de tres diluyentes sobre la supervivencia de semen canino almacenado refrigerado a 4° C. Rev. Bras. Reprod. Anim. 2001b; 25(3):468-70
38. Thomassen R, Farstad W, Krogenaes A, Fougner JA & Berg KA. Artificial insemination with frozen semen in dogs: a retrospective study. J Reprod Fertil Suppl 2001;57:341-6
39. Ward C. Reproductive Problems in Male Dogs. In: 30th Annual Canine Symposium; 2000 Jan 29; University of Pennsylvania: Bellwether summer 2000; 47. Available from: URL: <http://www.vet.upenn.edu/comm/publications/bellwether/47/canine-Symposium.html>