

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
INSTITUTO DE REPRODUCCIÓN ANIMAL

**“EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD FECUNDANTE DEL SEMEN CONGELADO
DE PERRO (*Canis familiaris*), EN OVA RECUPERADAS DE PERRAS EN CELO
INDUCIDO”**

Memoria de Título presentada como parte
de los requisitos para optar al TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO

LORELLA MABEL CORTI GONZALEZ

VALDIVIA – CHILE

2003

PROFESOR PATROCINANTE : -----
Dr. Renato Gatica García.

PROFESOR COLABORADOR : -----
Dr. Jorge Rubilar Bravo.

PROFESORES CALIFICADORES : -----
Dr. Orlando Garrido Oñate.

Dr. Mario Martínez Díaz.

FECHA DE APROBACIÓN: **3 de diciembre del 2003.**

**A mis padres, Dante y Mabel
y a mi hijo Lucas
...gracias...**

ÍNDICE

| | Página |
|------------------------------|---------------|
| 1. RESUMEN | 1 |
| 2. SUMMARY | 2 |
| 3. INTRODUCCIÓN | 3 |
| 4. MATERIAL Y MÉTODOS | 26 |
| 5. RESULTADOS | 32 |
| 6. DISCUSIÓN | 42 |
| 7. CONCLUSIONES | 48 |
| 8. BIBLIOGRAFÍA | 49 |
| 9. ANEXOS | 58 |
| 10. AGRADECIMIENTOS | 71 |

“EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD FECUNDANTE DEL SEMEN CONGELADO DE PERRO (*Canis familiaris*), EN OVA RECUPERADAS DE PERRAS EN CELO INDUCIDO”.

1. RESUMEN.

Este estudio fue realizado con el propósito de evaluar la capacidad fecundante del semen congelado de perro, en ova recuperadas de perras en celo inducido. Para este propósito, se seleccionaron 6 eyaculados, provenientes de 2 perros de fertilidad probada, y 6 perras, en estado de anestro, evidenciado mediante citología vaginal.

Los eyaculados fueron evaluados a través de un espermiograma convencional, y posteriormente congelados, en pajuelas de 0,5 ml utilizando como diluyente TRIS-Fructosa-ácido cítrico, 20% de yema de huevo, 8% de glicerol. Una vez almacenadas en nitrógeno líquido las muestras fueron descongeladas para ser evaluadas a través de la motilidad espermática. Los resultados promedio \pm desviación estándar de las variables estudiadas en el semen fresco fueron las siguientes: volumen $2,4 \pm 0,9$ ml, porcentaje de motilidad progresiva $76,6 \pm 4,1\%$, espermatozoides vivos y espermatozoides normales y $82,2 \pm 2,3\%$ y $81,4 \pm 3,1\%$, respectivamente. La concentración espermática fue de 254.935 ± 76.200 espermatozoides/mm³.

Las 6 perras seleccionadas, recibieron durante 10 días consecutivos una dosis diaria de 20 mg de Extracto Hipofisiario Equino (HAP), vía subcutánea, suspendida en 2 ml de agua destilada estéril. El día 11 del tratamiento se les inyectó una dosis única de 1000 UI de Gonadotrofina Coriónica Humana (HCG), vía intramuscular. Los días 15, 16 y 17 fueron inseminadas vía intravaginal, con el semen previamente descongelado. Entre los días 25 y 31 las perras fueron ovariectomizadas. A todas las hembras se les realizó citología vaginal desde un día antes de iniciar el tratamiento hasta el día 18 del mismo, para evidenciar las diferentes etapas del ciclo estral. Además se obtuvo muestras de sangre de cada una de ellas, con el fin de medir la concentración de progesterona plasmática. Los resultados promedio \pm desviación estándar de las variables estudiadas en las perras fueron los siguientes: el inicio del proestro fue a los $6,3 \pm 1,5$ días, con $67,5 \pm 6,9\%$ de células superficiales, el inicio del estro a los $11,3 \pm 1,6$ días, con 100% de células superficiales. La progesterona plasmática aumentó desde $0,3 \pm 0,8$ ng/ml, del día 0, a $25 \pm 14,6$ ng/ml el día 20 del estudio. El peso promedio de los ovarios fue de $3,9 \pm 1,9$ grs, con $19,3 \pm 7,5$ C.L. totales.

De este estudio se concluye que: es posible la congelación de semen de perro y obtener buenos resultados de motilidad después de congelado, previa selección de los eyaculados.

Es posible inducir celos fértiles con el tratamiento utilizado y lograr fecundación de las ova con semen congelado, mediante inseminación artificial intravaginal, con un porcentaje superior al 50% y que puede alcanzar hasta el 90%.

Palabras claves: Perro, semen, congelado, fecundación, inseminación artificial.

“EVALUATION OF THE FERTILITY OF FROZEN DOG (*Canis familiaris*) SEMEN IN OVA RECOVERED FROM BITCHES IN INDUCED HEAT”.

2. SUMMARY.

This study evaluated the fertility of frozen-thawed dog semen in ova recovered of bitches in induced heat. Six ejaculates selected from two fertile dogs were used to fertilize six bitches determined through vaginal cytology to be in anoestrus.

The ejaculates were evaluated using a conventional spermogram and then diluted in a TRIS-glucose-citrate extender containing 20% egg yolk and 8% glycerol. The samples were stored in 0.5 ml straws and then frozen in liquid nitrogen. Upon thawing, samples were evaluated for sperm motility. The average results \pm standard variation for the variables studied in the fresh semen were the following: volume 2.4 ± 0.9 ml; percentage of progressive motility 76.6 ± 4.1 %; live sperm and normal sperm 82.2 ± 2.3 % and 81.4 ± 3.1 % respectively. Sperm concentration was 254.935 ± 76.200 sperm/mm³.

The six bitches were given ten daily, subcutaneous doses of 20 mg HAP suspended in 2 ml of sterile distilled water. On day 11 each bitch was given a single intramuscular injection of 1000 IU of HCG. Vaginal insemination with frozen-thawed semen took place on days 15, 16 and 17, and ovariohysterectomies were performed between day 25 and 31. The vaginal cytology of all bitches was evaluated from the day before treatment until day 18 to identify the different stages of the oestral cycle. Blood samples were also taken from each female in order to measure the plasmatic progesterone concentration. The average results \pm standard variation for the variables studied in the bitches were the following: initial proestrus was at 6.3 ± 1.5 days with 67.5 ± 6.9 % superficial cells. Oestrus was initiated at 11.3 ± 1.6 days with 100% superficial cells. Plasmatic progesterone increased from 0.3 ± 0.8 ng/ml on day 0 to 25.0 ± 14.6 ng/ml on day 20 of the study. The average ovary weight was 3.9 ± 1.9 g with 19.3 ± 7.5 CL total.

It can be concluded from this study that the freezing of dog semen is possible with good results in motility after freezing, previous selection of ejaculates. The induction of fertile oestrus with the treatment employed is possible, and the percentage of ova fecundation using frozen-thawed sperm and vaginal insemination is greater than 50 % and can reach up to 90 %.

Key words: dog, semen, frozen, fertilization, artificial insemination.

3. INTRODUCCIÓN.

La primera inseminación artificial (IA) descrita en la literatura, se realizó en la especie canina y fue el biólogo italiano Lázaro Spallanzani en 1780, obteniendo cachorros después de inseminar una perra con semen fresco y, corroborada más tarde por el también italiano Rossi, en 1782, en esta misma especie (Nishikawa, 1964; Hape, 1987). Posteriormente Harrop (1960), describe el uso de semen canino refrigerado y Seager (1969) informa de la primera preñez lograda en perras usando semen canino congelado. Sin embargo, no ha sido esta especie la más beneficiada con este descubrimiento, ya que se ha utilizado preferentemente en otras especies, de mayor interés económico (Denis y Milanés, 1999).

En la actualidad y suscitado por el papel cada vez más importante que juega el perro dentro de la sociedad, el hombre se ha visto motivado a estudiar los aspectos relacionados con la reproducción en esta especie, donde sin duda la IA juega un papel determinante (Denis y Milanés, 1999). Otras tecnologías como la transferencia de embriones y la fecundación *in vitro* también se vienen desarrollando en esta especie desde los años setenta, sin embargo, los resultados obtenidos (número de embriones) aún distan de los esperados, por lo que estas tecnologías sólo se aplican a animales de un elevado valor genético y que presentan problemas reproductivos (anatómicos y fisiopatológicos) (Guérin, 1998).

En el mundo, numerosos investigadores trabajan para desarrollar técnicas relacionadas con la evaluación espermática y la preservación del semen tanto en estado fresco, refrigerado, como congelado, así como en la metodología adecuada para realizar la IA (Denis y Milanés, 1999). En todos los casos, los estudios están basados en la simplificación de las técnicas y la elevación de los indicadores reproductivos (número de hembras preñadas y crías por parto) (Denis y Milanés, 1999).

En nuestro país existe escasa información en el área de la reproducción canina, no obstante, en la actualidad y dado que la reproducción y crianza de perros es una afición de distribución mundial, para los médicos veterinarios y criadores, el tema de la preservación de semen y la IA adquiere especial relevancia (Fougner, 1989; Rota y col., 1995; Sánchez, 1998).

3.1- CARACTERÍSTICAS Y VALORACIÓN DEL SEMEN DE PERRO.

En el perro el eyaculado está constituido por tres fracciones. La primera, escasa en volumen, entre 0,5 y 2 ml, generalmente transparente, contiene pocos o ningún espermatozoide, correspondiendo a secreción uretral (Stabenfeldt y Shille, 1977; Badinand y col., 1990) y/o de la glándula prostática (Roberts, 1971; Andersen, 1980). La segunda fracción, también escasa en volumen, procede en su mayor parte del epidídimo, es de color blanco y consistencia viscosa, es la fracción más rica en espermatozoides, por lo que resulta la de máximo interés para la IA. La tercera fracción, la de mayor volumen, es un fluido claro

que se origina en la glándula prostática y es también, como la primera, pobre en espermatozoides (Foote, 1964; Andersen, 1980).

La función fisiológica de las distintas fracciones del eyaculado no se conoce, pero se sostiene que la primera podría arrastrar la orina de la uretra del perro, mientras que la tercera, arrastraría la segunda fracción a través del cervix de la hembra (England y Allen, 1992). La presencia de adrenalina, noradrenalina y prostaglandinas en el semen puede sugerir que el rol es la estimulación del tracto reproductivo de la hembra para el transporte espermático, controlando la frecuencia y amplitud de las contracciones de la musculatura circular y longitudinal del tracto reproductivo (Hafez, 1987).

La evaluación del eyaculado es parte importante del examen andrológico del macho (Hafez, 1996). La evaluación del semen canino se lleva a cabo después del examen clínico del animal; las características más comúnmente evaluadas son: el aspecto, que incluye la determinación del color, olor y densidad, el volumen, la concentración espermática, motilidad progresiva y morfología de los espermatozoides, considerando si se está trabajando con el eyaculado total o con una o dos de las fracciones seminales (Christiansen, 1989).

El volumen de semen obtenido es muy variable y depende de la edad, el tamaño, la frecuencia de recolección y la cantidad de líquido prostático recolectado del perro. El volumen normal puede variar de 1 a 40 ml por eyaculado (Hafez, 1996; Feldman y Nelson, 2000). La eyaculación frecuente causa menor volumen promedio y cuando se obtienen dos eyaculados en forma consecutiva, el segundo suele tener menor volumen. No es negativo un volumen pequeño, pero si se acompaña de una baja concentración espermática, el número de espermatozoides disponibles es limitado (Hafez, 1996). El volumen no tiene correlación con la fertilidad, a menos que el animal no eyacule (Feldman y Nelson, 2000).

Por lo general, el color del semen de perro va de blanco a opalescente y opaco (Hafez, 1996; Feldman y Nelson, 2000). La intensidad de la opacidad depende de la concentración de espermatozoides (Christiansen, 1989). Un semen claro e incoloro sugiere azoospermia. Se puede encontrar un tinte amarillento por contaminación con orina o pus. Un tinte verde, con o sin cúmulos, coágulos o escamas, sugiere pus e infección en el aparato reproductivo. Un tinte rojo sugiere la presencia de sangre, que suele provenir de la próstata o de un pene traumatizado. La presencia de sangre no necesariamente indica enfermedad (Feldman y Nelson, 2000). Sin embargo, la recurrencia de cualquier anomalía causa preocupación y sugiere un estudio adicional (Díaz y Arancibia, 1971).

El olor natural del semen es característico para cada especie, por lo tanto sólo puede ser reconocido por la experiencia (Díaz y Arancibia, 1971).

Se valora la motilidad de los espermatozoides individuales tan pronto como sea posible después de obtener la muestra de semen. Se coloca una gota de semen en un porta objeto previamente entibiado y se observa al microscopio a 200x hasta 400x en cuanto a movimientos de avance progresivo de espermatozoides individuales (Denis y Milanés, 1999; Feldman y Nelson, 2000). La valoración de la motilidad progresiva puede ser difícil en

muestras muy concentradas (Feldman y Nelson, 2000). La motilidad progresiva, es decir, cuando el espermatozoide avanza en sentido cefálico, se considera normal en los espermatozoides y se cree que refleja la viabilidad y capacidad de fecundar al óvulo. Una muestra normal de semen debe tener más del 70% de los espermatozoides con movilidad progresiva (Farstad, 2000a). Se valora de manera individual a los espermatozoides en cuanto al tipo de movimiento, aquellos que forman pequeños círculos o presentan movimientos laterales sin avance, no son normales. El porcentaje de espermatozoides con motilidad activa puede modificarse por exposición del semen a extremos de temperatura, diluyentes ácidos, agua, orina, pus, sangre o lubricantes (Feldman y Nelson, 2000). El primer eyaculado de un perro, después de un período prolongado de reposo sexual, puede contener un porcentaje mayor de espermatozoides viejos y muertos que se han almacenado en el epidídimo. Esto disminuye el porcentaje de espermatozoides con motilidad activa. Las muestras de semen obtenidas en días subsiguientes deberían ser más cercanas a la normalidad (Edwards, 1986).

También es importante la velocidad del movimiento progresivo. Se puede hacer una valoración subjetiva en una escala que va del 0 al 5, en la que el 0 implica que no existe movimiento de progresión (necrospermia), y 5, la velocidad más alta del movimiento de progresión. Un macho fértil normal suele tener un grado de velocidad en la progresión que oscila entre 3 y 5, y se aconseja que el semen que será conservado mediante crioconservación tenga una velocidad de progresión elevada, preferiblemente un grado 5, antes de ser congelado (Farstad, 2000a).

El número de espermatozoides por eyaculado se determina al multiplicar el número de espermatozoides por mililitro de semen (concentración) y, por el volumen total (en mililitros) recolectado (Denis y Milanés, 1999; Feldman y Nelson, 2000). El volumen total de semen depende, en parte, de la cantidad de líquido prostático claro (tercera fracción del eyaculado) obtenida, lo que lo hace extremadamente variable (Feldman y Nelson, 2000). El estudio de la concentración de espermatozoides por mililitro es por completo impreciso. Los espermatozoides se pueden contar con un espectrofotómetro calibrado, cámara de Coulter o hemocitómetro. El eyaculado se mezcla con suavidad y se combina con el diluyente (en proporción 1:50), para después colocar la mezcla en la cámara del hemocitómetro (Denis y Milanés, 1999). La cifra obtenida luego se multiplica por el volumen de eyaculado para obtener el número total de espermatozoides por eyaculado, que en el perro adulto normal es de 200 millones hasta más de 1.000 millones. El número de espermatozoides por eyaculado varía dependiendo, en parte, de la edad, la masa testicular, la actividad sexual y, la estación del año. Amann, (1986), sugiere que las razas más grandes tienen una mayor concentración de espermatozoides que las pequeñas.

La morfología espermática es uno de los análisis que muestra una información real de la calidad espermática (Foote, 1975). Se estudian al microscopio frotis de eyaculado sin diluir para observar anomalías estructurales de los espermatozoides. Esta valoración se realiza mejor con un microscopio de contraste de fases (Harasymawycz y col., 1976; Zalewski y Andersen, 1983; Denis y col., 1992; Pursel y col., 1992). Es posible teñir el frotis con tinta de la India o colorante de eosina-nigrosina (Hewitt y England, 1998). En este último caso, antes

de hacer el frotis, se mezcla con suavidad una gota de colorante de eosina-nigrosina y una gota de semen sobre un portaobjeto tibio y se permite que se seque al aire.

La valoración de la morfología espermática debe concluirse al microscopio con aceite de inmersión. Se valoran los espermatozoides individuales en cuanto a anomalías que ocurren en la cabeza, la pieza intermedia y la cola. Estas anomalías pueden subclasificarse en primarias y secundarias (Cuadro 1). Se cree que las anomalías primarias representan alteraciones de la espermatogénesis, en tanto que las anomalías secundarias son inespecíficas y pueden ocurrir durante el tránsito por el sistema de conductos (es decir, dentro del epidídimo), durante el manejo del semen o después de infecciones, traumatismos o fiebre (Johnston, 1991). Se deben contar y clasificar un mínimo de 200 espermatozoides; sólo se cuentan las cabezas libres, no las colas. Los machos normales suelen tener más del 70% de espermatozoides con morfología normal. Las anomalías primarias deben constituir menos del 10% y las secundarias menos del 20% de los espermatozoides defectuosos en el perro normal. No se han estudiado las correlaciones entre porcentajes de anomalías espermáticas y tasas de concepción en perros. Sin embargo, una tasa menor del 30% de defectos totales es considerado normal razonable en la valoración de espermatozoides caninos (Feldman y Nelson, 2000).

Cuadro 1: Defectos primarios y secundarios de los espermatozoides en el perro (Feldman y Nelson, 2000).

| Anomalías primarias | Anomalías secundarias |
|----------------------------------|------------------------------------|
| Cabeza | Cabezas o colas normales separadas |
| Todas las desviaciones | Acrosoma separado |
| Pieza intermedia | Curvatura de la pieza media |
| Inserciones abaxiales | Curvatura de la cola |
| Duplicación | Gota citoplasmática distal |
| Delgadez, rasgadura | |
| Tumefacción | |
| Gotas citoplasmáticas proximales | |
| Cola | |
| Espiral | |
| Múltiple | |

La capacidad fecundante de los espermatozoides se ha definido como la habilidad que tienen estas células para fecundar un ovocito fisiológicamente normal y estructuralmente intacto (Yanagimachi, 1994). Sin embargo tras esta sencilla definición hay un complejo proceso que incluye una serie de fases en las que el espermatozoide debe presentar las cualidades adecuadas para poder fecundar el ovocito, tales como el desencadenamiento de la

reacción acrosómica, la unión a la zona pelúcida, la penetración de la zona pelúcida, la unión con la membrana plasmática del ovocito y la fusión con dicha membrana (Berger, 1996).

La posibilidad de predecir la capacidad fecundante de un eyaculado mediante los análisis *in vitro* es un problema que no ha podido ser resuelto adecuadamente (Hammerstedt, 1996). Algunos autores proponen como causa de la inconsistencia de los resultados obtenidos, la evaluación de un número relativamente reducido de células, la gran influencia de la subjetividad del observador y la alta variabilidad que presentan muchos análisis seminales (Evenson y col., 1994; Saacke y col., 1994).

Los procedimientos estándares para el análisis de semen (recuento, morfología y motilidad espermáticos) son indicadores relativamente deficientes de la capacidad fecundante de los espermatozoides (Kell y Webster, 1990). Para que un macho se considere aceptable para la crianza, su análisis de semen debe superar los criterios mínimos establecidos para esas variables (Hafez, 1996; Feldman y Nelson, 2000). No obstante, el perro no necesariamente es fértil sólo porque cumpla con estos criterios. Del mismo modo, un macho no necesariamente es subfértil cuando no cumple con ellos. La azoospermia o necroospermia repetidas son las únicas características que permiten al médico veterinario declarar estéril a un macho. Incluso en estas circunstancias es importante recordar que un solo estudio de semen, aleatorio, no necesariamente refleja lo que está ocurriendo en los túbulos seminíferos ese día. Las alteraciones transitorias de la espermatogénesis pueden causar azoospermia u oligospermia reversible transitoria. Antes de declarar a un perro aparentemente azoospermico como estéril permanente, siempre se hacen varios análisis de semen durante los siguientes seis meses (Feldman y Nelson, 2000).

3.1.1.- Criterios para la valoración normal del semen.

Principales parámetros para valorar la fecundidad (Feldman y Nelson, 2000):

Espermatozoides totales: $> 200 \times 10^6$ por eyaculado.

Movilidad espermática: $> 70\%$ con avance progresivo hacia adelante.

Morfología de los espermatozoides: $> 70\%$ de formas normales.

Defectos primarios: $< 10\%$ de los espermatozoides.

Defectos secundarios: $< 20\%$ de los espermatozoides.

Parámetros adicionales.

Volumen del semen: variable de 1 a 40 ml por eyaculado.

Color del semen: blanco a opalescente y opaco.

pH seminal: 6.3 a 6.7 (líquido prostático, 6.0 a 7.4).

Citología seminal: eritrocitos, células epiteliales, leucocitos, bacterias ocasionales.

Fosfatasa alcalina seminal: > 5000 U/L.

Se han desarrollado unas pocas técnicas de laboratorio para evaluar la integridad fisiológica de los gametos masculinos, a través de aspectos como supervivencia, transporte y capacidad fecundante. La prueba ideal tendría que ser sencilla, rápida y objetiva, y guardar

alta correlación con la fecundidad. Se han propuesto numerosas pruebas y en muchas de ellas tal correlación es significativa. Por desgracia, en la mayor parte de estos procedimientos biofísicos hay un porcentaje de resultados falsos negativos y falsos positivos. Esto se debe principalmente a la falta de controles apropiados, a posible interacción con contaminantes microbianos del semen y a variabilidad en los detalles técnicos que a menudo no se describen apropiadamente en los trabajos. El método más utilizado, en la que se valora la capacidad fecundante de los espermatozoides, tiene relación con su capacidad de penetrar en óvulos de hámster, libres de zona pelúcida, prueba que se ha utilizado ampliamente en centros de fecundación *in-vitro* en humanos. Otra prueba descrita es la expansión hipoosmótica, basada en la evaluación de la integridad funcional de membranas espermáticas (Hafez, 1996).

3.2.- PRINCIPIOS DE LA CONGELACIÓN DE SEMEN.

La utilización de semen congelado de perro es común en Estados Unidos aunque la cantidad de dosis obtenida por eyaculado es menor que en otros animales. Esto es comprensible si tenemos en cuenta que el eyaculado de un perro contiene unos 500 millones de espermatozoides en promedio, frente a los 4.000 millones de un toro y los 25.000 millones de un verraco (Pazos, 2002).

La congelación de semen debe permitir realizar posteriormente una inseminación artificial con éxito, para ello se necesita de técnicas complejas. Además para proteger el curso de las etapas que han de descender su temperatura en nitrógeno líquido (- 196°C) y, la recuperación rápida de temperatura en el momento de la descongelación, es necesaria la mezcla con un diluyente apropiado (Pazos, 2002).

Desde 1950 numerosos trabajos han estudiado los componentes de los diluyentes, los que están principalmente constituidos por:

- Yema de huevo y/o leche.
- Azúcares (glucosa, fructosa o lactosa).
- Sustancias tampones o buffer (TRIS, citrato de sodio y bicarbonato sódico).
- Antibióticos o sustancias antibacterianas (penicilina, dihidroestreptomina, sulfamidas).
- Crioprotectores (glicerol, etilenglicol) (Pazos, 2002).

A diferencia del semen refrigerado, el semen que se somete al proceso de congelación, debe tener un crioprotector. Existen diversos crioprotectores, pero el más utilizado en la congelación de espermatozoides de perro, así como en los espermatozoides de otras especies, es el glicerol (De los Reyes, 2002; Silva y col., 2003). La concentración óptima del glicerol varía de acuerdo a los diluyentes (Mazur, 1985).

Los medios de dilución utilizados para preservar semen de diferentes especies cumplen con las siguientes funciones: 1) abastecer nutrientes como fuente de energía, 2) proteger contra el efecto dañino del enfriamiento rápido, 3) proporcionar un amortiguador para prevenir los cambios dañinos de pH cuando se forma ácido láctico, 4) mantener la presión osmótica

adecuada y el equilibrio electrolítico correcto, 5) inhibir el crecimiento bacteriano, 6) aumentar el volumen del semen de tal manera que pueda usarse para múltiples inseminaciones y 7) proteger a las células espermáticas durante la congelación (Graham, 1978).

Cuando una célula es colocada en un medio acuoso, y ésta es enfriada a temperaturas menores a 0°C, la formación de cristales de hielo se inicia en el medio extracelular. La cristalización del agua citoplasmática se inicia antes de alcanzar -1°C, sin embargo, las células permanecen sin congelarse hasta temperaturas de -10 a -15°C. Este fenómeno se denomina “super-enfriamiento celular”. Los cristales de hielo que se forman son de agua pura, lo que hace que se concentren los solutos en el medio extracelular, fenómeno que es termodependiente (Mazur, 1970). Las células sometidas a tales condiciones responden osmóticamente, dejando salir agua a través de su membrana con el fin de igualar la concentración de solutos. Durante la congelación las células se deshidratan, tendiendo así a igualar la diferencia de osmolaridad entre el medio intracelular super-enfriado y el extra celular hipertónico (Mazur, 1970).

Se considera que dos son los factores que participan principalmente en el daño celular por congelación: 1) la formación de hielo intracelular y 2) el efecto de solución. El primero se produce por una inadecuada deshidratación de las células, lo cual a su vez estaría influenciado por varios factores, como lo son la tasa de enfriamiento, la relación superficie/volumen de la célula, la constante de permeabilidad celular y el coeficiente de temperatura de dicha constante. Esta situación ha llevado a sugerir que la formación de hielo intracelular sería el factor responsable de la muerte celular, o que la deshidratación celular “per se” sería la causa de dicha muerte (Locksley y col., 1988).

El efecto solución en cambio, dañaría la célula cuando la velocidad de enfriamiento es más lenta que la óptima y por lo tanto las células aún no congeladas están sometidas a altas concentraciones de sales por largos períodos (Locksley y col., 1988).

Los mejores resultados, en cuanto a sobrevivencia espermática después del congelado, se obtienen cuando se produce un balance entre los procesos de deshidratación y de formación de cristales de hielo intracelular, cuando se determina la relación área volumen, la fragilidad de las membranas, la naturaleza y la concentración del crioprotector usado (Parkinson y Whitfield, 1987). Por esto se ha sugerido una técnica de tres pasos y de distintas velocidades de congelamiento:

- Primer paso o período de equilibrio: la muestra es enfriada lentamente desde la temperatura ambiente hasta una temperatura por encima de su punto de congelación (Anchordoguy y col., 1987). Por esto las pajuelas deben mantenerse a 5°C por 2 a 6 horas antes de someterse a cualquier velocidad de congelación para así obtener una buena congelabilidad y fertilidad (Dhmi y Sahni, 1993).
- Segundo paso: la muestra es congelada tan rápido como sea posible, minimizando el tamaño de los cristales de hielo (Anchordoguy y col., 1987).

- Tercer paso: la muestra congelada alcanza la temperatura de almacenamiento (-196°C), lo suficientemente rápido para evitar la recristalización (Anchordoguy y col., 1987).

Durante el proceso de enfriamiento, se producen en los espermatozoides efectos dañinos, los cuales pueden ser reducidos con crioprotectores (Quinn y col., 1980). Los crioprotectores son sustancias necesarias para mejorar la sobrevivencia celular después de la congelación, y han sido clasificados en dos grupos: 1) intracelulares o penetrantes, entre los que encontramos sustancias de bajo peso molecular como el glicerol, el dimetil sulfoxido (DMSO) y el etanol, entre otros, y 2) extracelulares o no penetrantes, que son macromoléculas como la sucrosa, rafinosa, péptidos de la peptona y algunas lipoproteínas (Meryman, 1971).

Las sustancias amortiguadoras son necesarias para mantener el pH casi neutro y la presión osmótica en unos 300 mOsm, la cual es equivalente a la del semen. El TRIS (hidroximetil) aminometano es una de estas sustancias, así como el Tricine, TES, MES y HEPES se han utilizado con éste objetivo (Hafez, 1987).

Los diluyentes utilizados en perros son la lactosa (Yubi y col., 1987), TRIS-glucosa-ácido cítrico (Foote, 1964) TRIS-fructosa-ácido cítrico (Gill y col., 1970) y PIPES-glucosa-citrato (Andersen, 1975).

Se sabe que la integridad del acrosoma del espermatozoide del perro, disminuye significativamente después del congelado (Ferguson y col., 1989), y se cree que algún cambio en la integridad y composición de la membrana espermática puede también disminuir la fertilidad (Rodríguez-Martínez y col., 1993).

El almacenamiento del semen congelado se ha efectuado principalmente en pajuelas de 0,25 ó 0,5 ml, aún cuando también se está utilizando en algunos centros la forma de pellets (Pazos, 2002; De los Reyes, 2002).

3.3.-CARACTERÍSTICAS REPRODUCTIVAS DE LA PERRA.

La perra doméstica (*Canis familiaris*), ha desarrollado una fisiología reproductiva que la diferencia de otras especies domésticas, como también de las especies caninas salvajes. Por ejemplo, posee prolongados períodos interestrales (5 a 12 meses), siendo indiferente a la estación del año y al largo del día. La luteinización y la producción progesterona ocurren antes de la ovulación, y la fase copulatoria continúa a pesar del alza de progesterona en la sangre (Feldman y Nelson, 2000).

Las perras se consideran monoéstricas no estacionales, presentando celos a lo largo de todo el año (Christiansen (1984), Concannon y Temple (1989), Jeffcoate (1999), Feldman y Nelson (2000); Gobello y Corrada (2003)).

La pubertad se alcanza 2 ó 3 meses después de haber alcanzado el tamaño adulto, es decir, luego de concluir la etapa de crecimiento (Gobello y Corrada, 2003) que

aproximadamente, es a los 6 meses de edad con un rango que varía de 5 a 12 meses (Feldman y Nelson, 2000), dependiendo de algunos factores como:

Raza: se ha determinado que la pubertad y el primer celo se presentarían antes en las razas pequeñas que en las grandes, teniendo además las primeras mayor número de celos durante su vida reproductiva (Feldman y Nelson, 2000). Sin embargo, hay variaciones considerables dentro de una misma raza, así como entre las diferentes razas (Concannon, 1987).

Clima: un clima favorable, vale decir sin variaciones extremas de temperatura, favorecería el inicio de la pubertad (Feldman y Nelson, 2000).

Nutrición: una dieta adecuada, lo más equilibrada posible, favorece una buena tasa de crecimiento y por consiguiente una pronta iniciación de la pubertad (Feldman y Nelson, 2000).

Enfermedades: cualquier enfermedad que influya en la tasa de crecimiento, ya sea directamente o por interferir con la alimentación y asimilación de los nutrientes, afectará el inicio de la pubertad (Feldman y Nelson, 2000).

Interacción con el macho: se piensa que un contacto temprano con el macho estimula una aparición temprana de la pubertad y los celos (Feldman y Nelson, 2000).

3.3.1.-Ciclo estral de la perra.

El ciclo estral de la perra se puede dividir en cuatro fases: un período de inactividad sexual (anestro), de duración variable (promedio: 75 días), le sigue el proestro, de duración promedio: 9 días (2-27 días), que se identifica por edema vulvar y descarga sanguinolenta. El estro, o período durante el cual la hembra aceptará al macho, es la tercera fase, produciéndose la ovulación de forma espontánea al comienzo de ésta fase del ciclo, que dura en promedio 9 días (3-21 días). Si no tiene lugar la gestación, el estro va seguido del diestro (promedio: 90 días), que acaba de forma imperceptible en el anestro (Jeffcoate, 1999).

Proestro: Este es el periodo de actividad folicular que precede al estro. Por lo general se define que el proestro empieza, cuando se observa por primera vez una hemorragia transvaginal y termina, cuando la perra permite a un perro que la monte y ocurra el apareamiento (Feldman y Nelson, 2000). Los mismos autores describen también en el inicio del proestro, la presencia de signos como el agrandamiento de la vulva, atracción de machos y cambios de conducta de la hembra hacia ellos. Además, éstos autores, utilizan para definir el inicio y la terminación del proestro, cambios en el aspecto de la mucosa vaginal observados con endoscopia o, cambios observados en una citología vaginal de células epiteliales vaginales. Ninguno de estos criterios único para notar el inicio del proestro es mejor o tan simple y confiable como la observación del primer día de una secreción vaginal sanguinolenta (Feldman y Nelson, 2000).

La perra en proestro se encuentra bajo la influencia de los estrógenos, que se sintetizan y secretan en los folículos ováricos en desarrollo. En el anestro, los folículos empiezan a

desarrollarse de manera periódica, pero no maduran sin el apoyo hormonal de la hipófisis (Concannon 1986). Los folículos que se desarrollan en un momento que coincide con la estimulación por gonadotrofinas, maduran y alcanzan la capacidad para sintetizar y secretar estrógenos, así como para desarrollar ovocitos maduros (Feldman y Nelson, 2000).

El tamaño de los ovarios aumenta durante todo el proestro (England y Allen, 1989a; 1989b; Wallace y col., 1992). Las concentraciones plasmáticas muy aumentadas de estrógenos durante el proestro se correlacionan con cambios en el útero, la mucosa vaginal y la vulva, y patrones de conducta en la perra. Justo antes del proestro hay un aumento en la concentración de estrógenos por arriba de 15 pg/ml. El proestro temprano, a menudo, se relaciona con cifras del estradiol mayores de 25 pg/ml y el proestro tardío con concentraciones que pueden ser mayores de 60 a 70 pg/ml. La concentración plasmática máxima de estradiol se alcanza 24 a 48 horas antes del término del proestro, es decir, antes del estro (Allen, 1993; Feldman y Nelson, 2000).

Las concentraciones de progesterona durante todo el proestro, salvo las últimas 24 a 72 horas, son bajas (basal < 0,5 ng/ml). El final del proestro y el principio del estro pueden identificarse por cifras plasmáticas de progesterona que aumentan por arriba de una meseta crítica (1 ng/ml, concentración de progesterona necesaria para la inducción de los cambios de conducta típicos del estro y cifra mínima requerida para conservar la preñez), en tanto disminuyen las concentraciones de estrógenos (Allen, 1993). La progesterona se secreta a través de folículos cada vez más luteinizados antes de la ovulación y después del desarrollo de cuerpos lúteos. De este modo, los folículos que producían estrógenos en etapas tempranas y medias del proestro, comienzan a producir estrógenos y pequeñas cantidades de progesterona al final del proestro. Cada vez se sintetiza más progesterona y menos estrógeno a medida que la perra avanza el estro (Feldman y Nelson, 2000).

Al final del anestro y en etapas tempranas de proestro se ha observado una serie de aumentos repentinos relativamente pequeños, pero potentes, de secreción de gonadotrofina (hormona luteinizante (LH)) a partir de la hipófisis, regresando a concentraciones basales durante todo el proestro. El principal aumento repentino de secreción de LH previo a la ovulación se relaciona con el inicio del estro. Este incremento de LH puede ocurrir al final del proestro en algunas perras y al principio del estro en otras, pero se relaciona a la transición entre las dos fases (Feldman y Nelson, 2000).

Varios tejidos “blanco de los estrógenos” se ven afectados por el incremento en las concentraciones séricas de estrógenos durante el proestro. Estos incluyen crecimiento de conductos y túbulos de las glándulas mamarias, proliferación de fimbrias de los oviductos, engrosamiento de éstos, alargamiento de los cuernos uterinos, engrosamiento del endometrio, incremento de la sensibilidad del miometrio, agrandamiento del cuello uterino, alargamiento y edema de la vagina y proliferación de la pared vaginal (Concannon y DiGregorio, 1986; Concannon, 1987; Arthur y col., 1991). La preparación para la implantación en el endometrio, incluye un incremento notorio del grosor de la pared y de la actividad glandular, cambios que se relacionan con el paso de eritocitos hacia el lumen. Este sangramiento uterino explica la

pérdida sanguínea transvaginal relacionada con el proestro y, en algunas perras, con el estro (Feldman y Nelson, 2000).

Estro: La palabra estro deriva de la palabra griega *oistros*, que significa, deseo vehemente. El estro incluye la etapa en la que la perra permite al macho montarla y aparearse. El primer día que la perra permite el apareamiento constituye el inicio del estro, fase que termina cuando ya no acepta al macho (Pineda, 1984).

Las concentraciones de estrógeno alcanzan su máximo uno a dos días antes del inicio del estro. De hecho, la perra suele empezar a mostrar signos de celo constante sólo cuando las concentraciones de estrógenos circulantes, una vez elevadas, declinan. La concentración decreciente de estrógenos séricos es reflejo del proceso final de maduración del folículo, algunos días antes de la ovulación (Feldman y Nelson, 2000).

La combinación de una concentración creciente de progesterona sérica y decreciente de estrógenos en los días finales del proestro estimula dos eventos importantes. El primero es el cambio de conducta de la perra, quien presenta resistencia pasiva al apareamiento en la fase tardía del proestro y pasa a la búsqueda activa en el estro (Holst y Phemister, 1975). El segundo evento, de igual importancia, estimulado por la cifra decreciente de estrógenos séricos y creciente de progesterona es la fuerte retroalimentación positiva hacia el hipotálamo y la hipófisis, la cual produce secreción de la hormona foliculoestimulante (FSH) y, más importante, de LH al inicio del estro (Holst y Phemister, 1975; Feldman y Nelson, 2000).

La progesterona sérica aumenta por arriba de la concentración basal antes de la secreción súbita de LH. En otras palabras, las células foliculares capaces de sintetizar y secretar progesterona son funcionales antes de la aparición de los cuerpos lúteos. Estas células producen el aumento inicial de la concentración de progesterona, vinculado con el último día del proestro, que causa el inicio del estro. Este aumento en la concentración de progesterona incrementa la intensidad y duración del estro conductual (Feldman y Nelson, 2000).

También se cree que las concentraciones declinantes de estrógeno y crecientes de progesterona dan lugar a la secreción súbita de LH en la perra (Concannon, 1987). Esta secreción inicia la ovulación en 24 a 72 horas, después de lo cual se forma el cuerpo lúteo. La cantidad de progesterona en la circulación aumenta de manera constante durante los primeros días del estro. Con el desarrollo de los cuerpos lúteos funcionales, la concentración de progesterona continúa en aumento durante un periodo de una a tres semanas y luego declina hasta la sexta a séptima semana (Holst y Phemister, 1975; Feldman y Nelson, 2000).

De este modo, el estro es un periodo de concentraciones decrecientes progresivas de estrógenos, crecientes progresivas de progesterona, y uno breve (de 12 a 24 horas) de secreción súbita de LH. Durante el proestro, la concentración de progesterona sérica suele aumentar a cifras de 0.5 a 1 ng/ml, después de concentraciones de anestro menores de 0,5 ng/ml. Alrededor de 24 a 48 horas antes de la secreción previa a la ovulación de LH, la correspondiente de progesterona sérica aumenta por arriba de 1 ng/ml y alcanza de 2 a 4 ng/ml al momento de la secreción súbita de de LH. Al momento de la ovulación, la concentración

sérica de progesterona suele ser de 4 a 10 ng/ml. Toda esta progesterona ha sido secretada antes del desarrollo de los cuerpos lúteos, estructuras no identificables hasta varios días después de la ovulación (Holst y Phemister, 1975; Christiansen, 1984; Feldman y Nelson, 2000).

Se ha demostrado que la perra normal tiene cifras crecientes de testosterona sérica durante el proestro. Esta hormona alcanza su concentración máxima cerca del momento de la secreción previa a la ovulación de LH y de la receptividad conductual. Después la cifra de testosterona declina (Olson, 1984a). No se ha determinado aún si la testosterona contribuye directamente a la conducta de estro o a la secreción de LH. Es posible que la testosterona sólo se derive de la progesterona durante la esteroidogénesis. La aromatización de andrógenos a estrógenos en el folículo puede ser un componente que contribuye al inicio de la conducta del estro en la perra (Olson, 1984a).

La ovulación, espontánea en la perra, ocurre 24 a 72 horas después de la secreción súbita de LH. La cantidad de óvulos liberados es variable, con rangos entre 5 a 15 por periodo ovulatorio. Los óvulos liberados son aún inmaduros (ovocitos primarios), requiriendo 2 a 5 días para terminar su meiosis y así poder ser fecundados (Benesch, 1965; Christiansen, 1984).

Se estima que todos los folículos ovulatorios se rompen en un periodo entre 12 a 96 horas. Puesto que este proceso no es perfecto, los óvulos no son liberados al mismo tiempo, pero están en etapas similares del desarrollo, lo que asegura que el desarrollo embrionario de todos los fetos ocurra de manera similar (Johnston, 1982).

Luego de la ovulación, la LH produce estimulación en la teca interna y las células de la granulosa, provocando su transformación en cuerpos lúteos. Estos secretarán activamente progesterona para la eventual gestación (Wildt y col., 1978).

El número de óvulos presentes en los ovarios de una perra recién nacida se calculan en 700.000. Para la pubertad disminuye a 250.000; a los 5 años a 30.000 y a los 10 años a sólo unos cuantos cientos. La fecundidad parece declinar de manera progresiva una vez que la perra cumple 7 años de edad o más (Feldman y Nelson, 2000).

Diestro: Este periodo se define como la fase de predominio de la progesterona que sigue al estro. Se relaciona con la actividad de los cuerpos lúteos. El diestro, abarcaría el momento en que la perra rechaza la monta y cópula del macho hasta el cese de la actividad luteal (Christiansen, 1984; Pineda, 1984).

El punto máximo en la síntesis de progesterona de estos cuerpos lúteos suele alcanzarse 20 a 30 días después de la ovulación. Esta tasa máxima de secreción ocurre alrededor de dos a tres semanas después de iniciado el diestro (Johnston, 1980).

No se tiene una comprensión adecuada de la causa de la declinación en la función lútea ni de su cese inevitable. Los cuerpos lúteos constituyen glándulas endocrinas funcionales que tienen una vida media inherente más bien breve. Se cree que la función declinante de los

cuerpos lúteos cesa de manera abrupta con el inicio del parto debido a la acción de las prostaglandinas que actuarían sobre los cuerpos lúteos degenerados, pero no hay un efecto luteolítico semejante en cuerpos lúteos más inmaduros. Las prostaglandinas pueden ser el único factor luteolítico en perras preñadas y no preñadas (Feldman y Nelson, 2000).

El útero no participa en la regulación de la vida media del cuerpo lúteo. La LH luteotrópica y la función del cuerpo lúteo canino puede depender de la secreción basal de LH durante la fase inicial y tal vez toda la fase lútea del ciclo ovárico (Concannon, 1980). Otros autores creen que la LH no es un factor tan importante en la función lútea y que la prolactina es el factor luteotrópico importante para la segunda mitad de la fase lútea (Okkens, 1985a; 1985b; Concannon, 1987).

La concentración de estrógenos en etapas tempranas del diestro suele estar en cifras basales (es decir, similar a la concentración en el anestro). Al principio los cuerpos lúteos sólo sintetizan progesterona, pero se ha demostrado que la concentración de estrógenos aumenta de manera sutil durante las últimas una o dos semanas de gestación (Concannon, 1987). Tal vez este ligero incremento en la síntesis y secreción de estrógenos ocurre en conjunción con concentraciones descendentes de progesterona como componente de las interacciones complejas que llevan al parto. En cualquier caso, estas bajas concentraciones de estrógenos no producen atracción de los machos o cualquiera de las alteraciones obvias vinculadas al proestro. No se sabe si la perra no preñada experimenta cambios similares en la concentración de estrógenos (Feldman y Nelson, 2000).

Los cuerpos lúteos se localizan en la superficie de los ovarios durante el diestro. El útero responde al aumento de la concentración de progesterona manteniendo la estructura glandular y la vascularidad requeridas para la preñez. El tamaño uterino máximo sin preñez, se observa 20 a 30 días después de iniciado el estro, momento que coincide con la concentración más alta de progesterona. En etapas más tempranas del diestro, las diferencias entre el útero con y sin preñez son insignificantes. Una vez que ocurre la implantación 17 a 21 días después de la fecundación, las unidades fetales esféricas se vuelven palpables (Feldman y Nelson, 2000).

Anestro: El anestro es la fase del ciclo reproductor femenino en la que el útero involuciona; se inicia con el parto y termina en el proestro. El inicio del anestro no es fácil de determinar en la perra no preñada, en la que clínicamente no hay una demarcación obvia entre diestro y anestro. Por tanto, el aparato reproductor durante el anestro se observa como en preparación para el inicio de otro ciclo, que se inicia con el próximo proestro. Esta fase también se conoce como periodo de quietud dentro del eje hipofisario-ovárico. Sin embargo, se han detectado fluctuaciones en la secreción de hormonas hipofisarias y ováricas (Concannon, 1986; Feldman y Nelson, 2000).

Al igual que otras fases del ciclo ovárico, el anestro varía en duración. Esta variación depende de la raza, la salud, la edad, la época del año, el ambiente y muchos otros factores. Es probable que la duración de la secreción de progesterona diestral sea el principal factor que determine el intervalo entre ciclos ováricos no fecundos (Feldman y Nelson, 2000).

Como en otras especies, ocurren brotes esporádicos de secreción de LH durante el anestro en la perra. Estos aumentos abruptos transitorios en la LH plasmática parecen causar dos periodos secretores breves pero potentes. Una secreción máxima de LH precede inmediatamente el inicio del proestro y otra precede o coincide con el inicio del estro y la ovulación subsiguiente. Se ha formulado la hipótesis de que estos pulsos paroxísticos aparentes de secreción hipofisiaria no ocurren al azar, sino que más bien representan un mecanismo delicado, necesario para la selección de folículos para el siguiente ciclo. Una vez seleccionados en el grupo, previo a la ovulación, estos folículos regulan de manera selectiva la secreción de gonadotrofinas hipofisiarias por mecanismos de retroalimentación negativa, lo que modifica el apareamiento, la ovulación y la fecundación (Feldman y Nelson, 2000).

La FSH no representa fluctuaciones amplias de concentración periférica como la LH. Más bien esta hormona parece tener variaciones leves de concentración durante el anestro, antes de disminuir con el inicio del proestro y aumentar con la LH para alcanzar un máximo de secreción previo a la ovulación (Olson, 1982; 1983).

Las concentraciones de estrógenos fluctúan de manera significativa durante el anestro, aunque parece haber cierto patrón de avance en dicha concentración. Se han observado aumentos de secreción de estrógenos y se supone que se derivan de ondas de desarrollo folicular de naturaleza subclínica y tal vez de vida breve. Estos folículos sintetizan y secretan estrógenos, lo que produce incrementos en su concentración circulante. Debido a que los folículos nunca maduran por completo, involucionan después de breves periodos de función, antes de que en un momento dado desarrollen células luteinizadas que podrían sintetizar progesterona. La concentración sérica de estrógenos disminuye antes del inicio del proestro (Olson, 1982). En contraste, la progesterona se mantiene en concentraciones muy bajas durante el anestro.

La determinación precisa del momento de la ovulación permite el óptimo manejo reproductivo en las perras (Kustritz, 2001).

El ensayo hormonal es la medición más exacta del momento de la ovulación en perras. Para determinar la concentración plasmática de progesterona se utilizan dos tipos de análisis: el Radioinmunoensayo (RIA) y ELISA (ensayo semicuantitativo inmunoabsorbente ligado a enzimas). El primero no se utiliza corrientemente en clínica por razones de costo, y además por necesitar demasiado tiempo en el análisis de las muestras. Las pruebas de ELISA si son aplicables con Kits comerciales, la ventaja de este método es que permite un análisis diario, por su rápido tiempo de análisis y por lo tanto es una herramienta útil para precisar el momento de la ovulación (Antelo, 2001).

Se desconoce el factor que inicia el proestro y un nuevo ciclo ovárico, lo que tal vez es producto de interacciones complejas entre el ambiente, la salud general, el estado ovárico, el estado uterino y la edad. Este concepto adquiere importancia clínica cuando se intenta mejorar la fecundidad mediante la administración parenteral de hormonas hipofisiarias, ováricas o de ambos tipos. Es difícil simular la delicada coordinación de sucesos que lleva a la ovulación (Feldman y Nelson, 2000).

3.3.2.- Citología vaginal en la perra.

La citología vaginal es un recurso muy útil en la reproducción canina. La comprensión de las aplicaciones clínicas aumenta su utilidad. No obstante, hay que señalar que la citología vaginal no responde algunas de las preguntas frecuentes. No puede identificar el día de la ovulación o fecundación; por tanto, no es posible precisar el día perfecto para la cópula mediante estos frotis. En retrospectiva, una vez que se identifica el primer día del diestro, es posible suponer que la ovulación ocurrió 6 ó 7 días antes. La citología vaginal no puede usarse para diagnosticar preñez. La observación de la conducta, más una revisión de la citología vaginal, constituyen un excelente par de valoraciones complementarias (Feldman y Nelson, 2000).

Los criterios para elegir un método para la toma de muestras para citología vaginal dependen de varios factores: 1) debe ser fácil de realizar y económico, 2) debe ser aplicable a las perras independiente de su tamaño y temperamento, 3) no debe ser doloroso y 4) debe dar buenos resultados sin importar la presencia o ausencia de secreción vaginal (Concannon y DiGregorio, 1986; Feldman y Nelson, 2000).

Para tomar una muestra, se utiliza una tórula, la que se introduce por la comisura dorsal de la vulva hasta alcanzar el conducto pélvico. Después se gira la tórula en ambas direcciones y se retira. Todo el proceso debe tomar sólo unos segundos y rara vez se produce dolor. La perra puede estar intranquila si no hay secreción vaginal. Por tanto, debe humedecerse el algodón con dos ó tres gotas de solución salina estéril, como lubricante, si la secreción vaginal no es obvia (Olson, 1989).

Una vez que se retira la tórula, la punta de algodón se gira con suavidad de un extremo al otro del portaobjeto unas dos o tres veces en líneas separadas. Por lo general, se preparan dos o tres portaobjetos con una tórula. Los portaobjetos con las células deben secarse al aire y después sumergirse en metanol de 95 ó 100% para evitar el deterioro o la distorsión celular. Luego se pueden teñir, o almacenar para teñir posteriormente (Olson., 1984a).

3.3.2.1.-Clasificación de las células vaginales: La nomenclatura de las células vaginales se basa en su morfología. La literatura más antigua hace mención de células queratinizadas en contraposición con no queratinizadas, o de células cornificadas en contraposición con no cornificadas. Algunas especies animales en realidad presentan una cubierta de queratina en la vagina debido a concentraciones circulantes cada vez más altas de estrógenos. Sin embargo, las perras no presentan una cubierta vaginal cornificada, lo que explica una nomenclatura diferente que describe las principales alteraciones en las células vaginales por la influencia de estrógenos. Estos diferentes tipos de células representan etapas de la muerte celular. A medida que mueren las células vaginales redondas y saludables, se vuelven más grandes y de forma más irregular. Los núcleos dentro de las células epiteliales de la vagina también sufren cambios que reflejan muerte celular; el núcleo se torna cada vez más pequeño y después picnótico antes de que termine por desintegrarse, lo que deja una célula anuclear (Feldman y Nelson, 2000).

Células parabasales: son las más saludables y pequeñas de las células vaginales. Estas células son redondas o un poco ovales y tienen un núcleo vesiculado grande y cantidades relativamente pequeñas de citoplasma. Son células que sufren exfoliación casi desde la capa de células germinales, cerca del aporte sanguíneo subyacente (Feldman y Nelson, 2000).

Células intermedias: varían de un poco más grandes que las parabasales a dos veces su tamaño. Estas células tienen bordes irregulares uniformes ovales a redondeados y un núcleo vesiculado, pero que por lo general es más pequeño que los que se encuentran en los parabasales. Este cambio en la morfología refleja el primer paso en la muerte celular: las células parecen más grandes, tienen cantidades relativamente mayores de citoplasma y muestran núcleos más pequeños. Para propósitos descriptivos, se clasifican como células intermedias pequeñas y grandes (Feldman y Nelson, 2000).

Células superficiales: son las células muertas típicas que revisten la luz vaginal de perras en estro y son las más grandes que se identifican en la citología. Tienen bordes citoplasmáticos angulares, planos y nítidos, además de núcleos pequeños, picnóticos y atenuados o no muestran núcleo (Feldman y Nelson, 2000).

Células superficiales nucleadas: son células vaginales que parecen tener núcleos vesiculados relativamente saludables, pero también tienen el borde citoplasmático angular, nítido y plano que es típico de células superficiales (Olson, 1984b; Olson, 1989). Las células superficiales intermedias proporcionan evidencia de efecto potente, pero incompleto de los estrógenos sobre la cubierta vaginal. El efecto completo de los estrógenos se relaciona con células superficiales y escamas anucleares (Feldman y Nelson, 2000).

Células superficiales anucleadas: son células vaginales grandes, muertas e irregulares sin núcleo, que representan el final de un proceso que empezó con células parabasales redondas y saludables. Esta muerte celular se origina por engrosamiento de la cubierta vaginal. Conforme la pared vaginal se engruesa en respuesta a incrementos en las concentraciones séricas de estrógenos, de varias capas celulares a 100 o 200, las que cubren el lumen se alejan del aporte sanguíneo y su muerte es inevitable. Son grandes y con bordes planos y angulares. También se les ha denominado “cornificadas o queratinizadas por completo” (Feldman y Nelson, 2000).

Células de metaestro: por lo general son células vaginales intermedias grandes que parecen tener uno o más neutrófilos contenidos en el citoplasma. Las células del metaestro suelen observarse en el frotis vaginal obtenido de una perra en diestro temprano o con vaginitis. Rara vez es posible observar estas células en el proestro temprano (Feldman y Nelson, 2000).

Células espumosas: son células parabasales e intermedias que tienen vacuolas citoplasmáticas obvias; pueden relacionarse con diestro y anestro (Feldman y Nelson, 2000).

El frotis vaginal de una perra en proestro temprano es similar al de una en anestro, con una diferencia. El proestro suele detectarse por sangre dentro de la vagina que proviene de un endometrio en rápido desarrollo. Además de cifras variables de eritrocitos, el frotis vaginal suele contener numerosas células epiteliales parabasales e intermedias grandes y pequeñas. Los neutrófilos son frecuentes en número variable y puede haber unas cuantas o muchas

bacterias. El fondo de estos frotis a menudo es granular o de aspecto sucio, debido a la presencia de secreciones viscosas cervicales y vaginales que captan una pequeña cantidad de colorante (Feldman y Nelson, 2000).

El porcentaje de células epiteliales vaginales de tipo parabasal e intermedias pequeñas disminuye de manera progresiva durante todo el proestro. En su lugar hay un porcentaje siempre creciente de células superficiales nucleadas y anucleadas (Feldman y Nelson, 2000).

En etapas finales del proestro, el frotis vaginal no contiene neutrófilos, la presencia de eritrocitos es variable y el fondo es claro. Más del 80% de las células vaginales son superficiales, con núcleos vesiculados, picnóticos o ausentes (células superficiales anucleares). No hay modificaciones de la citología vaginal que permitan distinguir entre etapas finales del proestro y el estro (Feldman y Nelson, 2000).

Es importante recordar que algunas perras tienen secreción vaginal sanguinolenta sólo durante unos cuantos días del proestro (si es que ocurre), la mayor parte durante todo el proestro, algunas durante todo el proestro y estro y, por último, algunas tienen pérdida sanguínea vaginal en el proestro, que continúa hasta bien avanzado el diestro (Feldman y Nelson, 2000).

Durante el estro, la citología vaginal se mantiene relativamente sin cambios. Ninguna característica de la citología vaginal identifica el día de la secreción máxima de LH, la ovulación o el momento de la fecundación. Las células superficiales constituyen más del 80% del total de las células vaginales y a menudo alcanzan el 100% (Shutte, 1967).

La citología vaginal de una perra al inicio del diestro es claramente diferente a la de aquella en estro. Los frotis obtenidos durante los días finales del celo no son diferentes a los del estro temprano, con más del 80% de células superficiales y ausencia de neutrófilos. En un periodo de 24 a 48 horas al término del estro, el porcentaje de células superficiales disminuye a casi el 20% y la mayor parte son intermedias, parabasales o de ambos tipos. Este cambio significativo en el aspecto microscópico de las células epiteliales vaginales individuales, suele ser el primer indicador de que se ha iniciado el diestro. La presencia o ausencia de neutrófilos no es un criterio confiable. La conducta del macho o la hembra es aún menos confiable que la citología (Olson, 1989).

En ocasiones se pueden ver células específicas del metaestro vinculadas con la fase de diestro. Estas células se han utilizado como auxiliares en un intento por distinguir entre el proestro temprano y el inicio del diestro (Feldman y Nelson, 2000).

Después de los días iniciales de diestro, los frotis de citología vaginal de esta fase, simulan los del anestro. Puede o no haber leucocitos, no hay eritrocitos o se encuentran en cifras pequeñas y las células epiteliales, por lo general, constan de intermedias pequeñas y parabasales. La citología vaginal de una perra normal cambia de manera gradual del diestro al anestro, del anestro al proestro y del proestro al estro. Sin embargo, las alteraciones observadas cuando se vigila la progresión del estro al diestro casi siempre son abruptas. Al

estudiar la infecundidad y en un intento por detectar fechas de parto, es de importancia crítica detectar el primer día del diestro (Feldman y Nelson, 2000).

La citología vaginal del anestro es relativamente constante. Se observan sobretodo células epiteliales parabasales e intermedias. Puede o no haber neutrófilos y, por lo general, los eritrocitos están ausentes. Pueden o no observarse bacterias y, cuando se presentan, suelen representar a la flora normal. El aspecto del fondo después de la tinción puede ser claro o granuloso (Feldman y Nelson, 2000).

3.4.-INDUCCIÓN DE CELO EN PERRAS.

Diversos métodos para inducir celo y ovulación en perras, se han desarrollado en el último tiempo, esto se debe en gran parte a la necesidad terapéutico-reproductiva que se ha presentado en la actualidad en las perras (acortamiento del anestro patológico y fisiológico). Ello hace fundamental la intervención del médico veterinario en la necesidad de poder acortar los períodos interestrales prolongados y estimular el retorno al celo en perras cuyo ciclo estral haya sido suprimido hormonalmente (Concannon y col., 1975).

Los diversos protocolos de tratamiento para la inducción de celo en perras en anestro, coinciden en la administración de gonadotrofinas exógenas o estimulación de la producción de gonadotrofinas endógenas por 10 días o más (Chakraborty y Seager, 1986).

En los primeros experimentos reportados en perras, se utilizaron inyecciones de extracto urinario de hembras preñadas, con resultados que variaron desde la manifestación de algunos a todos los signos clínicos externos de estro (Feldman y Nelson, 2000). Luego se probó con gonadotrofina sérica de yegua preñada (PMSG), gonadotrofina coriónica humana (HCG), hormona luteinizante (LH) y hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH), administrándose por separado o en combinación, con diversos resultados (Versteeger y col., 1997).

Algunos de los métodos utilizados para la inducción de celo usando gonadotropinas exógenas han incluido: 1) administración seriada de FSH para inducir el desarrollo de folículos y el proestro, 2) lo mismo que el punto anterior, pero seguido de LH o HCG para causar la ovulación de los folículos inducidos, 3) protocolos similares pero precedidos de tratamientos estrogénicos usados para sensibilizar el eje hipofisiario-ovárico (Gobello, 2001).

El dietilestilbestrol (DES), también se ha usado para la inducción de ciclos estrales. Sin embargo, con el uso de estrógenos siempre se debe considerar la potencial aparición de piometras, neoplasias mamarias y otros problemas genitales (Gobello, 2001).

Basados en los estudios de Okkens y col., 1985, los agonistas dopaminérgicos (AD) como la bromocriptina y la cabergolina fueron recientemente incluidos en los métodos disponibles para la inducción de ciclos estrales. Aunque los AD no están disponibles en el mercado veterinario se pueden utilizar los de uso humano (Gobello, 2001).

El extracto hipofisiario equino (HAP), un producto crudo obtenido de hipófisis equinas provenientes de matadero, tiene efectos gonadotróficos (FSH y LH) con lo es posible inducir desarrollo folicular y ovulación (Gatica, 1985).

Como no existe un producto comercial de este extracto, sólo se han podido realizar trabajos experimentales, siendo este producto utilizado para inducir superovulación y ovulación en diferentes especies; Moore y Shelton (1964); Crosby y col. (1980), en ovinos. En bovinos ha sido usado por Moore (1975) y Boland y col. (1981). Salas (1984) en caprinos. Sciarresi y col. (1984) en terneras prepúberes y, Bustamante (1987) y Godoy (1998) en perras.

El objetivo de la superovulación es inducir en la hembra un número mayor de ovulaciones al que presenta en forma natural en cada uno de sus ciclos estrales (Araya, 1995).

Este objetivo se ha logrado mediante la utilización de preparados gonadotróficos, administrándolos en momentos determinados del ciclo estral (natural o inducido) en cantidades que superan el nivel endógeno normal (Foote y Onuma, 1970).

Se ha indicado que estas gonadotrofinas estimularían la actividad mitótica en folículos preantrales y antrales pequeños (Monniaux y col., 1983), o que actuarían previniendo o interviniendo el proceso natural de atresia (Moor y col., 1980; Seidel y Seidel, 1982; Monniaux y col., 1984).

Uno de los principales problemas que presentan los tratamientos superovulatorios, es la marcada variación individual en la respuesta que se obtiene al aplicar cualquiera de los tratamientos en uso (Monniaux y col., 1983).

Se piensa que esta alta variabilidad estaría determinada por diferentes factores, tales como, aquellos del ambiente y condiciones en que son mantenidas las hembras, de la hormona y el tratamiento empleado en la inducción de superovulación, o aquellos propios del animal (Murphy y col., 1987).

Se ha señalado como factor importante de variación ovulatoria la diferente población folicular presente en los ovarios de las hembras al momento de iniciar el tratamiento superovulatorio (Monniaux y col., 1983), así como la diferente sensibilidad ovárica a iguales niveles de gonadotrofinas (Gordon, 1982).

Desafortunadamente, no se tiene un tratamiento hormonal que proporcione respuestas uniformes en términos de número de ovulaciones, calidad de ovocitos liberados, número y viabilidad de ovocitos fecundados (Moor y col., 1984).

3.5.- INSEMINACIÓN ARTIFICIAL (IA).

Existen varias situaciones en que se recurre a la IA. La razón más obvia para practicarla es una incapacidad percibida del macho y la hembra para aparearse (Allen, 1993; Feldman y Nelson, 2000; De los Reyes, 2002). En la perra, estos problemas incluyen estrecheces vaginales, defectos en la conformación, debilidad de las extremidades traseras, problemas psicológicos y dolor (De los Reyes, 2002). La IA también se utiliza para asegurar la fecundación en fases tempranas del estro en hembras con infertilidad por causas desconocidas (Feldman y Nelson, 2000).

Los mismos autores señalan, que en el macho, las causas que pueden evitar la cópula normal son defectos físicos adquiridos que les impiden el apareamiento (debilidad, artritis, dolor lumbar), eyaculación prematura y defectos en la conformación que impiden la penetración o cópula. La IA también se prefiere en caso de diferencias importantes de tamaño entre macho y hembra. Los problemas psicológicos (como timidez, inexperiencia, antipatía por la pareja, dificultades de apareamiento previas) también pueden originar la necesidad de recurrir a la IA.

Allen (1993), señala que entre las ventajas de la IA en perros se encuentran las siguientes: se evitan los viajes, con lo que se reduce el estrés, la difusión de enfermedades, permite el uso de perros en distintos países sin las limitaciones que impone la cuarentena, y además, permite la conservación de semen congelado tras la muerte del perro donante.

Es importante tener en cuenta que el perro deposita el semen en el fondo vaginal en la monta natural, pero en el momento en que la cópula termina, los espermatozoides han alcanzado los oviductos (Tsutsui, 1989). La vagina parece ofrecer un medio desfavorable para los espermatozoides caninos, pues una gran proporción de estos pierde sus colas minutos después de su deposición en la vagina. (Linde-Forsberg, 1995).

La alta eficiencia de la IA con semen congelado, depende de: 1) semen de elevada calidad, 2) técnica adecuada de descongelamiento e inseminación del semen, 3) salud y buena condición reproductiva de las hembras y 4) inseminación en el momento adecuado del ciclo estral. Esto último es en extremo importante. Los espermatozoides viables deben estar en la vecindad del óvulo y ser capacitados (cuando menos en la mayor parte de las especies) poco después de la ovulación. Dado que esta última es difícil de detectar, la inseminación debe programarse con respecto al estro (Hafez, 1996; De los Reyes, 2002).

La tarea más difícil en la IA es estimular al macho para que eyacule. Una vez que esto se logra, el proceso es bastante sencillo. El semen debe recolectarse en una habitación limpia y tranquila con piso no resbaloso. Por lo general no se necesita una hembra. Cuando el bulbo del glande comienza a aumentar de tamaño, el prepucio se desliza en dirección posterior y se exterioriza el pene con el bulbo del glande erecto. Por lo general, la falta de exteriorización tanto de la parte libre del glande, como del bulbo, imposibilita la erección completa y produce eyaculación nula o incompleta, tal vez a causa de dolor. Una vez que se han extraído el pene y el bulbo, del prepucio, se debe sostener con firmeza la base del pene por detrás del bulbo del

glande. Se utilizan los dedos pulgar e índice, proporcionando masaje y presión descendente alrededor de la base del bulbo eréctil (Feldman y Nelson, 2000).

El número mínimo total de espermatozoides recomendado para una inseminación con semen congelado puede variar de 100 a 200 millones (Farstad, 2000b). Sin embargo, se han obtenido gestaciones con un número menor de espermatozoides, al depositarlo directamente en el útero (Wilson, 1993), incluso con un número de 35 a 40 millones de espermatozoides si la inseminación se hace en el momento óptimo y si el semen una vez descongelado es de muy buena calidad (Farstad, 2000b).

Es importante considerar, que a diferencia del semen fresco, que se sabe permanece fértil de 4-6 días en el tracto reproductivo de la hembra (Doak y col, 1967), el semen refrigerado se conserva hasta 48 horas a 4 ó 5°C, y que el semen congelado sólo sobrevive, después de descongelado, hasta máximo por 24 horas a temperatura ambiente (Antelo, 2001).

Denis y Milanés (1999), describen dos formas de realizar la IA canina, ya sea con semen fresco o congelado, depositándolo en el fondo de la vagina (intravaginal) y la otra en el interior del útero (intrauterina transcervical). La técnica quirúrgica, para semen congelado, depositando el semen en el útero ha sido reportada por Smith y Graham (1984), aunque del punto de vista práctico no es aplicable (Morton y Bruce, 1989). Silva y col. (1995), describen la IA intrauterina laparoscópica.

3.5.1.- Inseminación Artificial intravaginal:

Para esto se necesita un catéter de plástico rígido unido a una jeringa. Se aspira el semen hacia el interior del catéter, luego se introduce el catéter verticalmente, en sentido dorsal, a través de los labios de la vulva, y al llegar a la parte posterior del isquion se dirige cranealmente. Si la perra lo permite, el catéter será palpado generalmente a través de la pared abdominal y el cuello uterino se localiza como una estructura dura craneal al mismo. (Allen, 1993).

El mismo autor señala, que se deben levantar las extremidades posteriores de la perra para depositar el semen, en este momento puede ser necesario introducir aire a través del catéter para asegurar su vaciado. Al estimular el vestíbulo de la perra con un dedo se provocan contracciones vaginales que ayudan a pasar el semen hacia el interior del útero. Recién luego de 15 a 20 min la perra se deja en pie y se intenta evitar la emisión de orina durante unos 10 minutos.

3.5.2.-Inseminación Artificial intrauterina transcervical:

Esta técnica ha sido empleada con éxito tanto para el semen fresco como congelado (Harrop, 1960; Tsutsui, 1989 Linde y Forsberg, 1989; Denis y col., 1992).

Estos autores señalan que un catéter plástico debe ser colocado a través de la vulva hacia el fondo de la vagina en dirección dorsocraneal, fijando con la otra mano el cérvix a

través de la pared abdominal. Esta acción se favorece ya que durante el proestro y el estro, el cervix se encuentra aumentado de tamaño, por lo que manipulando éste es posible el paso del catéter hacia el interior del útero. Logrado esto resulta fácil introducir por dentro de éste el catéter propio de IA acoplado a una jeringa que contiene el semen. Para facilitar el transporte de los espermatozoides desde el útero a los cuernos, se recomienda realizar masajes en la vulva y mantener el animal durante varios minutos con el tren posterior elevado.

3.5.3.- Inseminación Artificial intrauterina quirúrgica:

Se han usado varios procedimientos quirúrgicos con la perra bajo anestesia general y en decúbito dorsal. Después de la preparación quirúrgica de rutina se hace una incisión de 4 - 6 cm en el centro, entre el pubis y el ombligo, sobre la línea blanca. El útero se exterioriza a través de la incisión, y se inserta una aguja -acoplada a una jeringa conteniendo el semen- en el lumen del cuerpo uterino en un ángulo de 45° con el bisel hacia arriba. El semen se inyecta lentamente en el útero y debe fluir fácilmente con una obvia distensión de los cuernos uterinos. Después de que se retira la aguja, se mantiene una gasa embebida en solución salina sobre el sitio de la inyección. Después de un minuto la gasa se remueve, el útero se reposiciona y el abdomen se cierra con métodos rutinarios de cirugía abdominal (Hutchison, 1993).

3.5.4.- Inseminación Artificial intrauterina laparoscópica:

La laparoscopia abdominal con semen congelado ofrece una alternativa más aceptable a la cirugía tradicional en la IA del perro (Silva y col., 1995). Una vez localizado uno de los cuernos uterinos, se introduce una pinza laparoscópica por medio de una incisión en la piel del abdomen del lado opuesto al ovario localizado, a través del monitor se sujeta con la pinza el cuerno uterino a nivel del oviducto y se aproxima a la pared abdominal del mismo lado; con un catéter unido a una jeringa de tuberculina, cargada con el semen, se perfora la piel, posteriormente el cuerno uterino y se deposita el semen en dicho cuerno, luego se retira la aguja y la pinza y se realiza la operación en el otro cuerno uterino (Linde-Forsberg y col., 1999).

En base a todos los antecedentes señalados se formuló la siguiente hipótesis:

- La eficiencia de fecundación con semen congelado es mayor al 50%.

Para resolver la problemática establecida en este estudio y corroborar o rechazar la hipótesis, se han propuesto los siguientes objetivos:

- Congelar semen canino.
- Inducir celo con HAP, en perras en anestro clínico.
- Inseminar perras en celo inducido con HAP.
- Demostrar la capacidad fecundante en ova recuperados de perras inseminadas.
- Determinar la tasa de fecundación del semen congelado.

4.- MATERIAL Y MÉTODOS

4.1.- MATERIAL.

4.1.1.- Animales experimentales:

Se utilizaron 6 perras adultas clínicamente sanas y en estado de anestro clínico, el cual fue determinado por citología vaginal e historial. Se les realizó un examen clínico reproductivo para determinar la condición corporal general y la normalidad del tracto reproductivo. Las perras fueron mantenidas durante el estudio en el Hospital Veterinario de la Universidad Austral de Chile, en jaulas individuales, con comida y agua controladas.

Se utilizaron además 4 machos provenientes de un criadero ubicado en las cercanías de la ciudad de Valdivia (Granja canina “Río Pichoy”), clínicamente sanos y desparasitados, de fertilidad probada y con parámetros seminales óptimos pre y post congelación. Se les realizó un examen clínico reproductivo a través de la inspección y palpación de los genitales, para constatar la presencia e integridad de los testículos, epidídimos, escroto, prepucio y pene.

4.1.2.- Material de recolección de semen:

Guantes de látex.

Embudos de vidrio.

Tubos cónicos de centrífuga, con tapa rosca de 15 ml.

Caja de plumavit para el transporte del semen al laboratorio.

4.1.3.- Material de evaluación de semen fresco:

Portaobjetos y cubreobjetos.

Pipetas de 25 a 100 microlitros con tips.

Microscopio.

Platina temperada para microscopio.

Platina temperada para material.

Cámara de Neubauer.

Contador manual de células.

Solución de Eosina al 5%.

Solución de Nigrosina al 10%.

Tubos Ependorff de 1 ml.

4.1.4.-Material para dilución y congelación:

Diluyente TRIS- Fructosa- ácido cítrico, 20% yema de huevo, 8% de glicerol.

Tubos cónicos de centrífuga, con tapa rosca de 15 ml.

Pajuelas de 0,5 ml.

Gradilla para las pajuelas.
Refrigerador con una temperatura de 4 a 5°C.
Caja de plumavit para congelado con Nitrógeno líquido con gradilla.
Pinzas.
Canastillos de aluminio para almacenados de las pajuelas en el tanque.
Termo con Nitrógeno líquido de almacenamiento de semen y embriones congelados.

4.1.5.- Material para descongelación e Inseminación Artificial:

Vaso plástico.
Termómetro.
Platina temperada para microscopio.
Pipetas.
Microscopio.
Contador de células manual.
Tubos Ependorff de 1 ml.
Pipetas para T.E en bovinos.
Jeringas de 10 ml.
Guantes de látex.

4.1.6.- Material hormonal:

Extracto Hipofisiario Equino (HAP): elaborado en el Instituto de Reproducción Animal, de la Universidad Austral de Chile, siguiendo el método descrito por Moore y Shelton en 1964 (Anexo 1), con la modificación de utilizar la hipófisis completa. Este extracto fue probado, antes de ser utilizado en perras, en ratones Rockefeller.

Gonadotrofina Coriónica Humana (HCG); Chorulón ®¹.

4.1.7.- Material para medición de progesterona plasmática:

Progesterona CAC 100T ®².

4.1.8.- Material para citología vaginal:

Portaobjetos.
Tómulas.
Alcohol Metílico.
Tinción Giemsa.
Microscopio.

¹ Laboratorio Intervet.

² Laboratorio Clinitest Ltda.

4.1.9.-Material para recuperación de ova:

Cirugía para remoción del tracto reproductivo.
PBS y solución salina.
Agujas 21G con punta roma.
Lupa estereoscópica.

4.2.- MÉTODOS.

4.2.1.- Obtención de semen:

Los eyaculados fueron recolectados a través de estimulación digital, sin perra celadora, en el criadero, obteniéndose sólo la primera y segunda fracción y luego fueron transportadas al laboratorio del Instituto de Reproducción Animal, en una caja de plumavit.

Las muestras se recolectaron con un intervalo de 7 días (5, 11,18 de julio).

4.2.2.- Evaluación seminal:

Las siguientes características seminales fueron evaluadas como lo describe el espermiograma convencional, para especies domésticas, de Díaz y Arancibia (1971):

- Registro de volumen a temperatura ambiente ($\pm 20^{\circ}\text{C}$).
- Motilidad progresiva: se depositó una gota en un portaobjeto sobre una platina temperada a 37°C , para determinar; porcentaje de espermatozoides con movimiento cefálico, en un microscopio de contraste de fase, a 200 y 400 x.
- Vivos/muertos y morfología espermática: se determinó del porcentaje de vivos/muertos con tinción de Blom (eosina-nigrosina), además de morfología espermática (tinción de Karras), para lo que se contabilizaron 200 células bajo un aumento de 1000 x.
- Concentración espermática: determinada por recuento en cámara de Neubauer (hemocitómetro), previa dilución (1:100), en agua.

4.2.3.- Congelación de semen:

Para la congelación los eyaculados fueron diluidos en TRIS-fructosa-ácido cítrico, 8% glicerol y 20% yema de huevo (Rubilar, 1999), (Anexo 2) alcanzando una concentración entre 57-120 millones de espermatozoides por ml aproximadamente, luego se envasaron en pajuelas de 0,5ml, previamente identificadas. Posteriormente el semen fue refrigerado a 5°C por 2 horas, antes de ser congelado en vapor de nitrógeno líquido sobre una rampa a 4 cm de distancia de la superficie por 10 minutos, y luego sumergidos en el nitrógeno líquido y transferidos a un termo para almacenarlos.

4.2.4.- Inducción de celo y ovulación:

El preparado de HAP, previamente suspendido en 2 ml de agua destilada esterilizada, se administró a las hembras en dosis de 20 mg, vía subcutánea diariamente, durante 10 días.

El día 11 o cuando se observó un 100% de células cornificadas, se le aplicó una dosis única de 1000 UI de HCG vía intramuscular (Bustamante, 1987).

Se realizaron frotis vaginales día por medio a cada una de las perras a fin de determinar los cambios citológicos que ocurrieron en ellas por acción de los esteroides gonadales. Las muestras fueron teñidas con Giemsa para poder estimar el momento del ciclo estral.

En los días 0, 7, 11, 15, 17 y 20 del estudio se obtuvieron muestras de sangre en tubos que contenían heparina, las que fueron centrifugadas a 10 minutos, con el fin de obtener plasma, el que fue congelado para poder medir al final del estudio las concentraciones de progesterona (ng/ml), también para determinar el momento del ciclo estral y así poder relacionarlo al momento en que se produce el pico de LH y la ovulación.

4.2.5.- Inseminación Artificial:

Las 6 perras se inseminaron en el fondo vaginal, 4 días post la administración de HCG, repitiéndose cada 24 horas por 3 días.

4.2.5.1.- IA intravaginal: Se utilizó una pipeta de Transferencia de Embriones para bovinos, unida a una jeringa de plástico que contenía el semen. La pipeta se introdujo apoyada en la comisura superior, en sentido dorsal a través de los labios de la vulva, y al llegar a la parte posterior del isquion se dirigió cranealmente. Durante la inseminación se mantuvo a la perra con las extremidades posteriores levantadas y luego por 10 a 15 min se mantuvo en decúbito dorsal.

4.2.6.- Remoción del tracto reproductivo:

Entre los días 25 y 31 de iniciado el tratamiento con HAP, es decir, 14 a 20 días después de la administración de la IA, las hembras fueron sometidas a cirugía bajo anestesia general, para extraer ovarios, oviducto y útero. La cirugía se realizó en el Hospital Veterinario de la Universidad Austral de Chile y los tractos fueron transportados hasta el laboratorio del instituto de reproducción animal en placas con suero fisiológico.

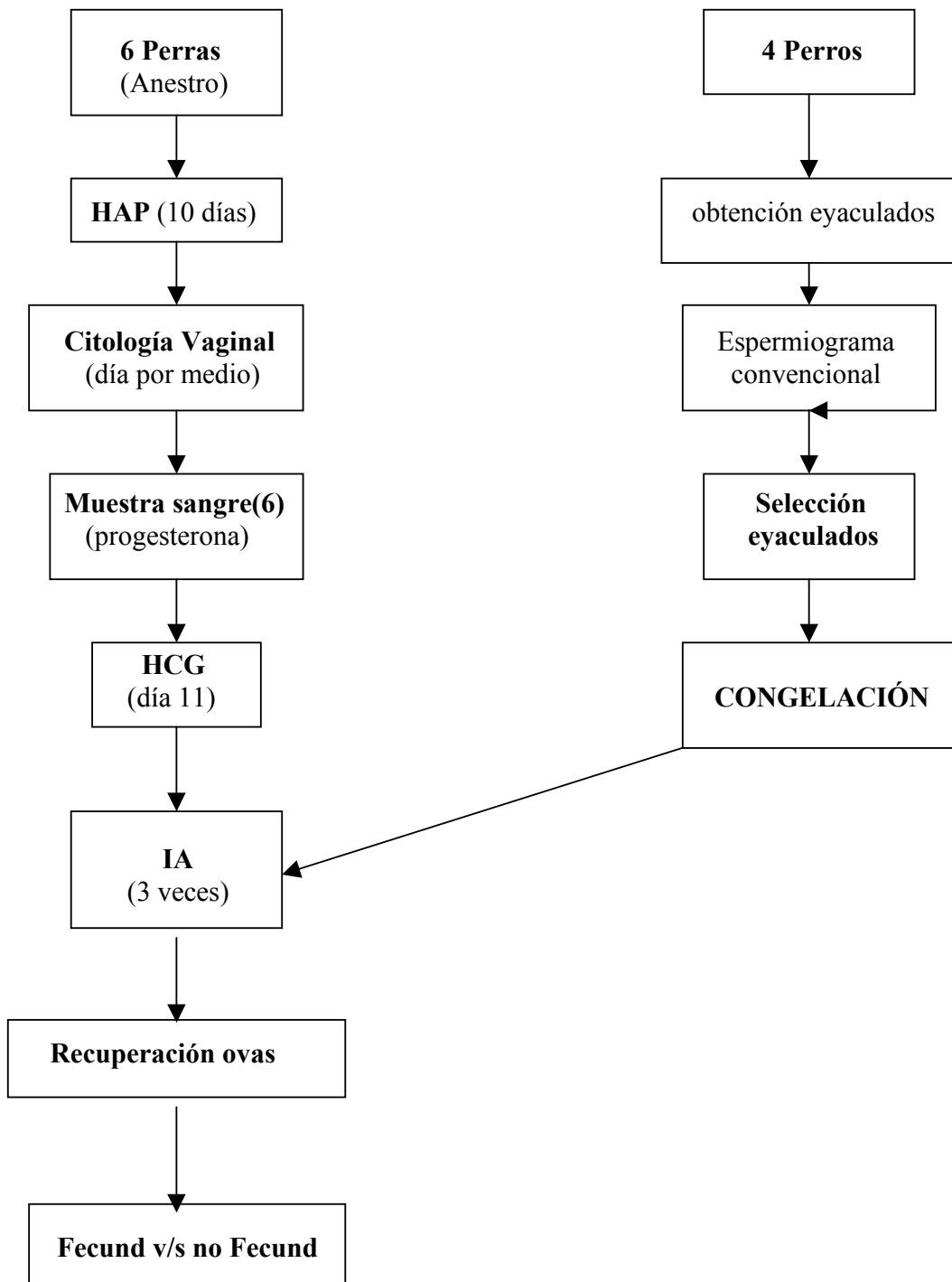
Los ovarios fueron separados para contar los cuerpos lúteos presentes bajo lupa estereoscópica.

Para la recuperación de ova, se separaron los cuernos a nivel del cuerpo uterino, para poder lavar cada cuerno por separado. Para esto se utilizó suero fisiológico con un 2% de suero bovino, que fue infundido desde el oviducto al cuerno sobre un vaso colector. Posteriormente, el medio obtenido fue observado bajo lupa estereoscópica para determinar la presencia de ova, y determinar si éstos estaban fecundados o no.

Por motivos prácticos, en este estudio se define como ova fecundada aquella que presenta división celular.

4.3.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para el análisis de resultados, se utilizó el método descriptivo. Los datos obtenidos fueron ingresados a planillas Excel, calculando promedios y desviación estándar.

4.4.- ESQUEMA DE TRABAJO.

5.- RESULTADOS

5.1.- ANÁLISIS DEL SEMEN FRESCO.

De 4 perros disponibles, se obtuvo un total de 10 eyaculados, los que fueron evaluados a través del espermiograma convencional (Anexo 3). El 100% de ellos respondió en forma positiva a la recolección a través del método de manipulación digital.

Se congelaron 6 eyaculados (3, 4, 6, 8, 9, 10) correspondientes a 2 perros (C y D), ya que los eyaculados restantes (1, 2, 5, 7), presentaron alta mortalidad y bajo movimiento progresivo (menor al 70%).

Entre las características macroscópicas de los 6 eyaculados seleccionados para congelar (1ª y 2ª fracciones), de 2 perros (Tabla N° 1), se observó el volumen, el cual varió entre 2,5 y 4 ml. El color, varió de blanco a blanco amarillento. El olor, en todas las muestras, fue calificado como *sui generis*, con distintas intensidades para cada uno de ellos.

Tabla N° 1: Características macroscópicas encontradas en 10 eyaculados (1ª y 2ª fracciones), obtenidos por manipulación digital, de 4 perros.

| N° Eyaculado | Volumen (ml) | Color | Destino |
|---------------|------------------|---------------------------|--------------------|
| 1 | 1,5 | Blanco | Eliminación |
| 2 | 2 | Blanco | Eliminación |
| 3 | 3 | Blanco | Congelación |
| 4 | 2 | Blanco | Congelación |
| 5 | 1 | Blanco | Eliminación |
| 6 | 4 | Blanco-opalescente | Congelación |
| 7 | 2,5 | Blanco | Eliminación |
| 8 | 2 | Blanco | Congelación |
| 9 | 3,5 | Blanco | Congelación |
| 10 | 2,5 | Blanco-amarillento | Congelación |
| X± D.E | 2,4 ± 0,9 | | |

X± D.E: Promedio ± Desviación estándar

Las características microscópicas de los 6 eyaculados, seleccionados para congelar, evaluadas a través del espermiograma convencional, en relación a los porcentajes de motilidad progresiva, porcentaje de espermatozoides vivos (tinción de Blom; Figura N° 1), y de espermatozoides normales (tinción de Karras), además de la concentración espermática, expresada como número de espermatozoides por mm^3 , y de los espermatozoides totales, se presentan en la Tabla N° 2.

Tabla N° 2: Promedio y desviación estándar de las características microscópicas encontradas en 6 eyaculados (1ª y 2ª fracciones), obtenidos por manipulación digital, de 2 perros, evaluados a través del espermiograma (Anexo 4).

| n = 6 | M.P (%) | Esperm. Vivos (%) | Esperm. normales (%) | Concentración (esp/ mm^3) | Esperm. Totales/eyaculado ($\times 10^6$) |
|----------------|------------|-------------------|----------------------|-------------------------------------|---|
| X ± D.E | 76,6 ± 4,1 | 82,2 ± 2,3 | 81,4 ± 3,1 | 254.935 ± 76.200 | 733,3 ± 352,2 |

n: Número de eyaculados; X: Promedio; D.E: Desviación estándar; M.P: Motilidad progresiva; Esperm.: Espermatozoides.

5.1.1.- Morfología espermática.

Los resultados obtenidos con relación a las anomalías encontradas según ubicación en el espermatozoide (Tabla N° 3), muestran un mayor porcentaje de presentación de éstas en la cola, y un menor porcentaje en pieza intermedia y cabeza, respectivamente.

Tabla N° 3: Promedio y desviación estándar de las anomalías encontradas según ubicación en el espermatozoide, en 6 eyaculados (1ª y 2ª fracciones), obtenidos por manipulación digital, de 2 perros (Anexo 5).

| n = 6 | Tipo de anomalía | | | | | | Espermatozoides Normales | |
|----------------|------------------|-----------|--------------|-----------|------------|-----------|--------------------------|----------|
| | Cabeza | | Pieza Inter. | | Cola | | N | % |
| | N | % | N | % | N | % | | |
| X ± D.E | 7 ± 0,8 | 3,5 ± 0,5 | 11 ± 2,2 | 5,5 ± 0,7 | 19,2 ± 6,8 | 9,6 ± 4,9 | 162,8 ± 6,1 | 81 ± 3,1 |

n: Número de eyaculados; X: Promedio; D.E: Desviación estándar; N: Número de espermatozoides; Pieza Inter: Pieza intermedia.

En relación a las anomalías primarias y secundarias (Tabla N° 4), se observa un mayor porcentaje de presentación de las segundas sobre las primeras, siendo ambas, en conjunto, inferiores al 20 %, en relación a los espermatozoides normales.

Tabla N 4: Promedio y desviación estándar de la morfología espermática, según anomalías primarias y secundarias, de 6 eyaculados frescos (1ª y 2ª fracciones), obtenidos por manipulación digital, de 2 perros (Anexo 6).

| n = 6 | Características morfológicas (%) | | |
|----------------|----------------------------------|------------------|--------------------|
| | Esp. Normales | Anorm. primarias | Anorm. Secundarias |
| X ± D.E | 81,4 ± 3,1 | 3,5 ± 0,5 | 15,1 ± 3,1 |

n: Número de eyaculados; X: Promedio; D.E: Desviación estándar; Esp.: Espermatozoides; Anorm.: Anormalidades.

5.2.- ANÁLISIS DEL SEMEN CONGELADO.

Luego de descongelado el semen, se evaluó el porcentaje de motilidad progresiva (Anexo 7), la que fluctuó entre 40 y 50%, obteniéndose un promedio ± desviación estándar de 45,8 ± 3,8% en los 6 eyaculados (1ª y 2ª fracciones), obtenidos por manipulación digital, de 2 perros.

5.3.- RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON HAP DE LAS 6 PERRAS.

De las perras en estudio, se tomaron muestras para citología vaginal, día por medio, para poder evaluar la respuesta al tratamiento con HAP, y así determinar el día de inicio del proestro y estro (Tabla N° 6).

Tabla N° 6: Promedio y desviación estándar del inicio del proestro y estro, determinados mediante citología vaginal, en 6 perras tratadas durante 10 días consecutivos con 20 mg de HAP (Día 1: 1º día de tratamiento con HAP) (Anexo 8).

| N = 6 | Inicio proestro | | Inicio estro | |
|----------------|-----------------|------------|--------------|-------|
| | Días | % C.S | días | % C.S |
| X ± D.E | 6,3 ± 1,5 | 67,5 ± 6,9 | 11,3 ± 1,6 | 100 |

n: Número de eyaculados; X: Promedio;
D.E: Desviación estándar; C.S: Células superficiales.

El porcentaje de células superficiales (Gráfico N° 1; Figura N° 4), aumentó progresivamente en relación a las células parabasales e intermedias (Figura N° 2 y N° 3), en las 6 perras, alcanzando el 100% entre los días 10 (perras 2-3-5), 12 (perra 4) y 14 (perras 1-6) del estudio.

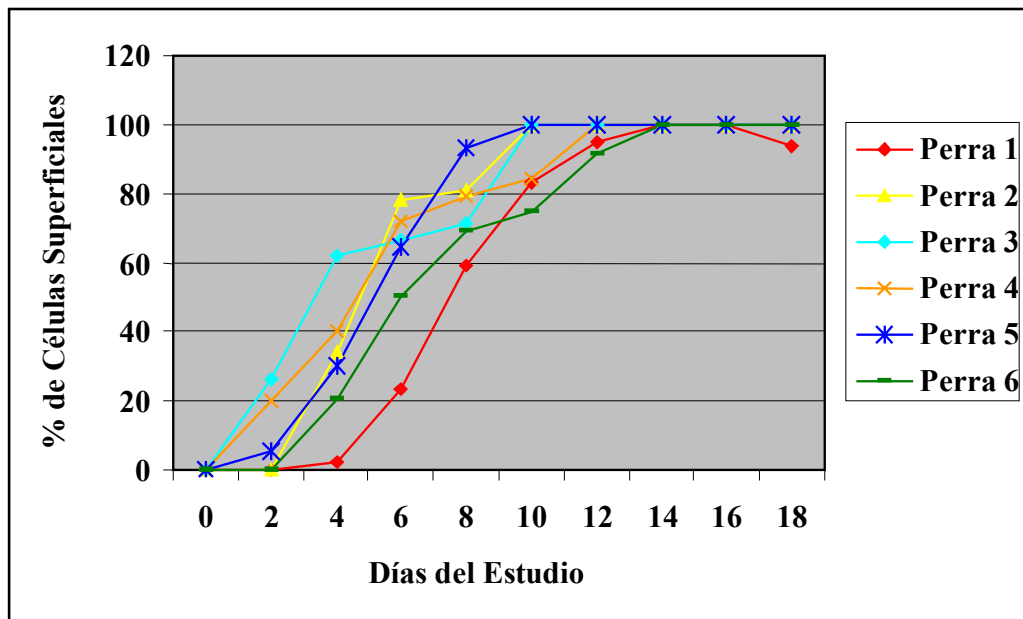


Gráfico N° 1: Porcentajes de células superficiales, obtenidos mediante citología vaginal durante 18 días, de las 6 perras tratadas durante 10 días consecutivos con 20 mg de HAP, e inseminadas los días 15, 16 y 17 del estudio (Anexo 9).

El día 11 de iniciado el tratamiento con HAP, se le inyectó a cada perra 1000 UI de HCG para inducir ovulación. Para observar los cambios en los niveles de progesterona plasmática que se produjeron durante todo el tratamiento hormonal (Tabla N°7) se les tomó los días 0, 7, 11, 15, 17 y 20 de estudio una muestra de sangre, cuyos valores mínimos fueron de 0 ng/ml de progesterona el día 0 del tratamiento y de 52 ng/ml, el máximo, el día 20 del estudio.

Tabla N° 7: Promedio y desviación estándar de la progesterona plasmática (ng/ml), medida los días 0, 7, 11, 15, 17 y 20 de iniciado el tratamiento con HAP en las 6 perras del estudio (Anexo 10).

| n = 6 | Días | | | | | |
|----------------|----------|----------|----------|------------|---------|----------|
| | 0 | 7 | 11 | 15 | 17 | 20 |
| X ± D.E | 0,3± 0,8 | 2,7± 1,8 | 8,3± 6,3 | 18,4± 10,1 | 19± 8,5 | 25± 14,6 |

X: Promedio; D.E: Desviación estándar

5.3.1.- Respuesta ovárica.

En relación a la repuesta ovárica (Tabla N° 8; Figura N° 5), no existieron diferencias en el peso y número de cuerpos lúteos de un ovario con respecto al otro, en las 6 perras del estudio.

Tabla N° 8: Promedio y Desviación estándar del peso ovárico y número de cuerpos lúteos, en las 6 perras del estudio, ovariectomizadas los días 14 (perras 1-2-3), 18 (perra 4), 19 (perra 5) y 20 (perra 6), de administrada la HCG (Anexo 11).

| N = 6 | Ovario 1 | | Ovario 2 | | Peso Total (gr) | C.L. totales |
|----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------------|--------------|
| | Peso (gr) | C.L | Peso (gr) | C.L | | |
| X ± D.E | 2,1 ± 1 | 9,5 ± 2,8 | 1,9 ± 1 | 9,8 ± 4,8 | 3,9 ± 1,9 | 19,3 ± 7,5 |
| | | | | | | |

n: Número de eyaculados; X: Promedio; D.E: Desviación estándar; C.L: Cuerpo lúteo.

5.4.- RECUPERACIÓN DE OVA Y ESTADO DE DESARROLLO.

La recuperación de ova (Tablas N° 9; Figura N° 6), sólo fue posible en 5 de las perras del estudio (1-2-3-4-5). En la perra 6 en el lavado uterino, pero no se encontraron ova. Se observó un mayor número de ova no fecundada en las perras 1-2-3, ovariectomizadas el día 14 después de la administración de HCG, en relación con las perras 4-5, ovariectomizadas los días 18 y 19 respectivamente, en las cuales el número de ova fecundadas es superior a las no fecundadas.

Tabla N° 9: Promedio y desviación estándar de la determinación de ova fecundadas y no fecundadas en 5 perras ovariectomizadas los días 14 (perras 1-2-3), 18 (perra 4) y 19 (perra 5), de iniciado el estudio (Anexo 12).

| n = 5 | | Ova | | | | |
|----------------------|----------------|---------------|-------------|------------|-------------|------------|
| | | No Fecundadas | | Fecundadas | | Total |
| | | N | % | N | % | N |
| Perra (1-2-3) | X ± D.E | 12,7± 9,5 | 61,6± 4,4 | 8,7± 6,8 | 38,4 ± 4,4 | 21,3± 16,3 |
| Perra (4-5) | X ± D.E | 4 ± 4,2 | 16,8 ± 12,9 | 16 ± 5,7 | 83,2 ± 12,9 | 20 ± 9,9 |

X: Promedio; D.E: Desviación estándar

A pesar de la diferencia en los días en que las perras fueron sometidas a la ovariectomía, 4 de las perras presentaron ova de 1-2-4-8 células y sólo de 1-2 células la perra 3. La diferencia, en este caso se presenta en la cantidad de ova de una célula, que fue mayor para las perras ovariectomizadas el día 14, con relación a las ovariectomizadas los días 18 y 19, de administrada la HCG, en las que se obtuvo mayor cantidad de ovas de 2-4-8 células (Tabla N° 10).

Tabla N° 10: Estado de desarrollo de las ova recolectadas, en 5 de las perras ovariectomizadas los días 14 (perras 1-2-3), 18 (perra 4) y 19 (perra 5), de administrada la HCG (Anexo 13).

| N° Perra | N° de células | | | | Total |
|-----------------|---------------|-----------|-----------|----------|------------|
| | 1 | 2 | 4 | 8 | |
| 1 | 20 | 11 | 2 | 1 | 34 |
| 2 | 16 | 9 | 1 | 1 | 27 |
| 3 | 2 | 1 | 0 | 0 | 3 |
| Subtotal | 38 | 21 | 3 | 2 | 64 |
| 4 | 1 | 5 | 2 | 5 | 13 |
| 5 | 7 | 9 | 10 | 1 | 27 |
| Subtotal | 8 | 14 | 12 | 6 | 40 |
| Total | 46 | 35 | 15 | 8 | 104 |

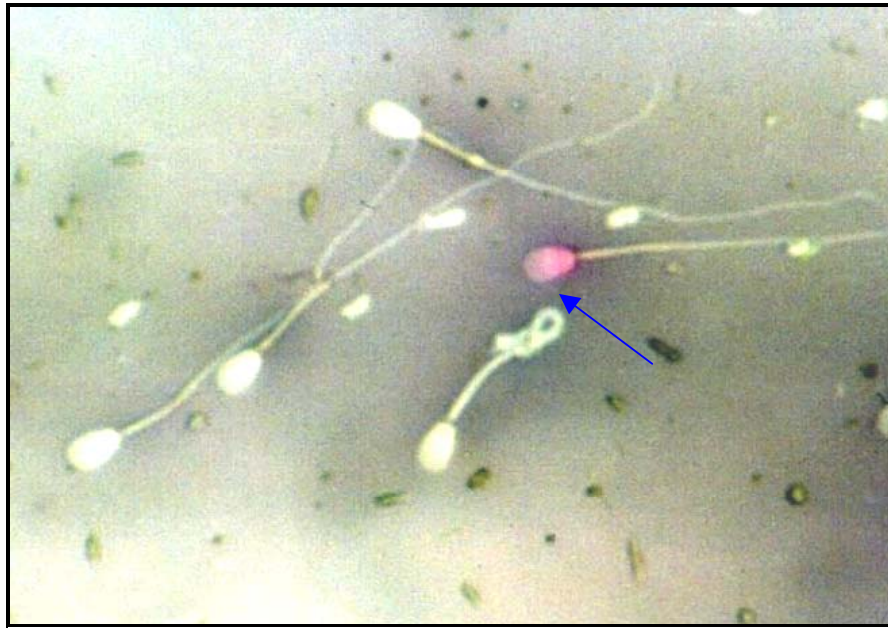


Figura N° 1: Tinción de Blom, utilizada para determinar el porcentaje de espermatozoides vivos v/s muertos (↑). 400x.

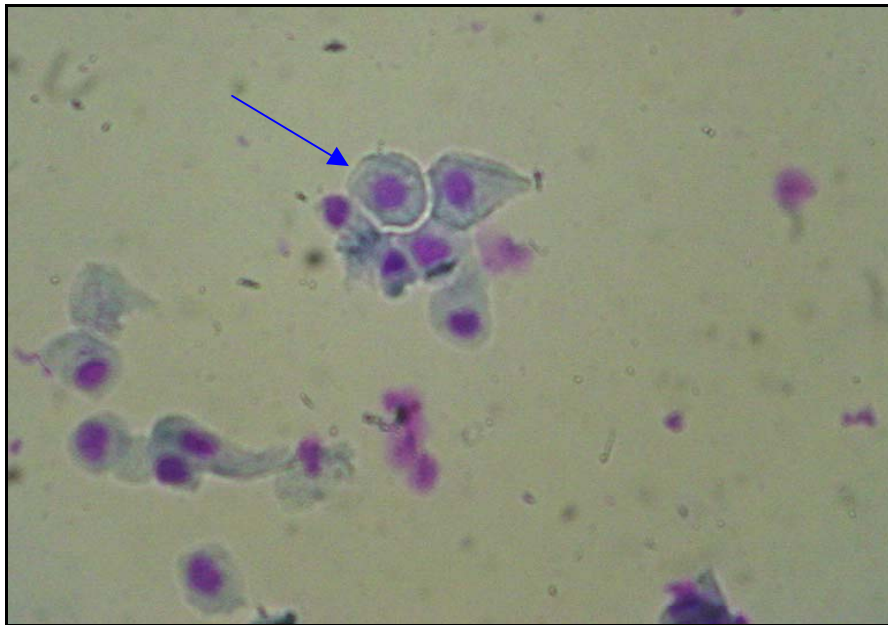


Figura N° 2: Frotis vaginal de perra en anestro, se observan células parabasales (↑). Tinción de Giemsa. 400x

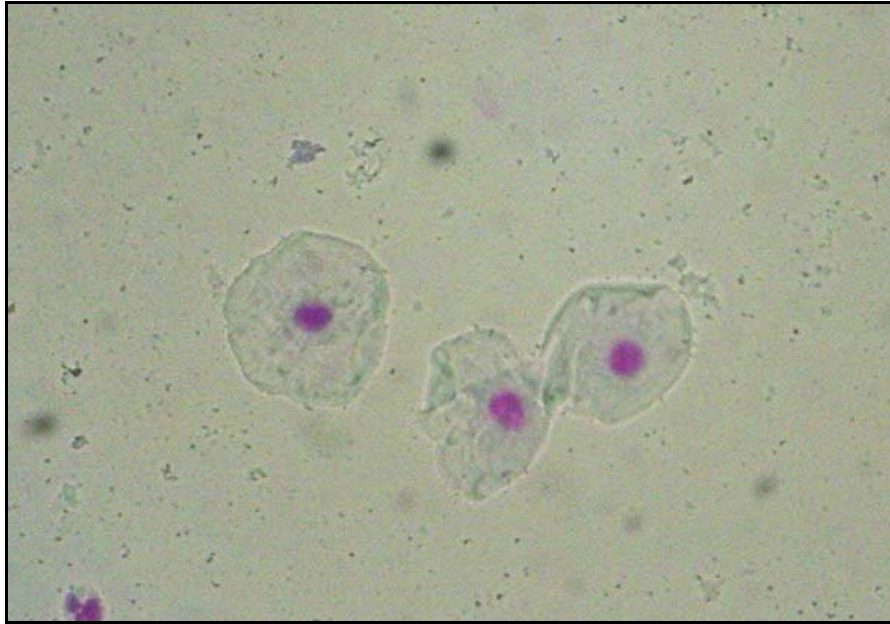


Figura N° 3: Frotis vaginal de perra en proestro, se observan células intermedias. Tinción de Giemsa. 400x

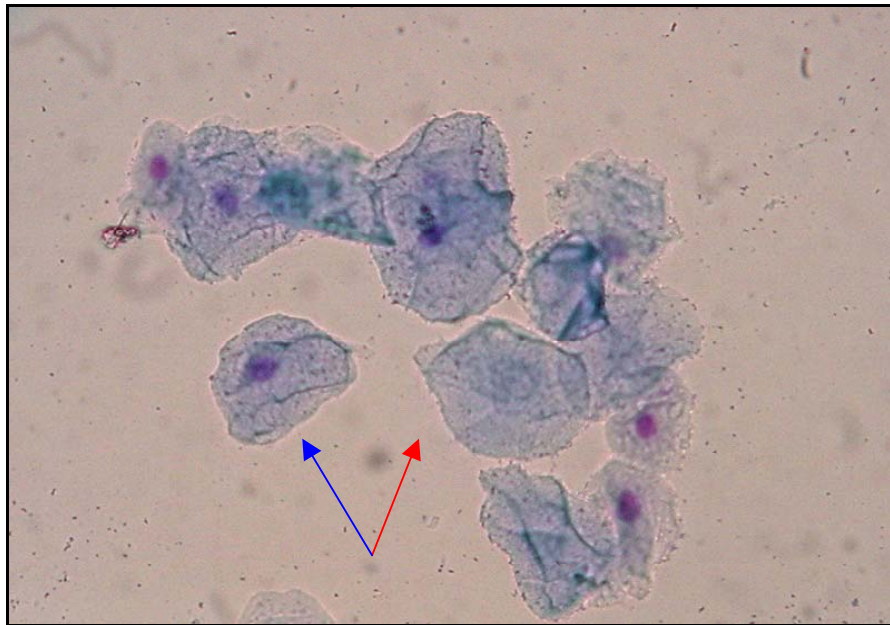


Figura N° 4: Frotis vaginal de perra en estro, se observan células superficiales con núcleos picnóticos (↑) y células superficiales anucleadas (↑). Tinción de Giemsa. 400x



Figura N° 5: Ovarios extraídos el día 25 posterior al inicio del tratamiento con HAP. Se observa gran cantidad de CL.

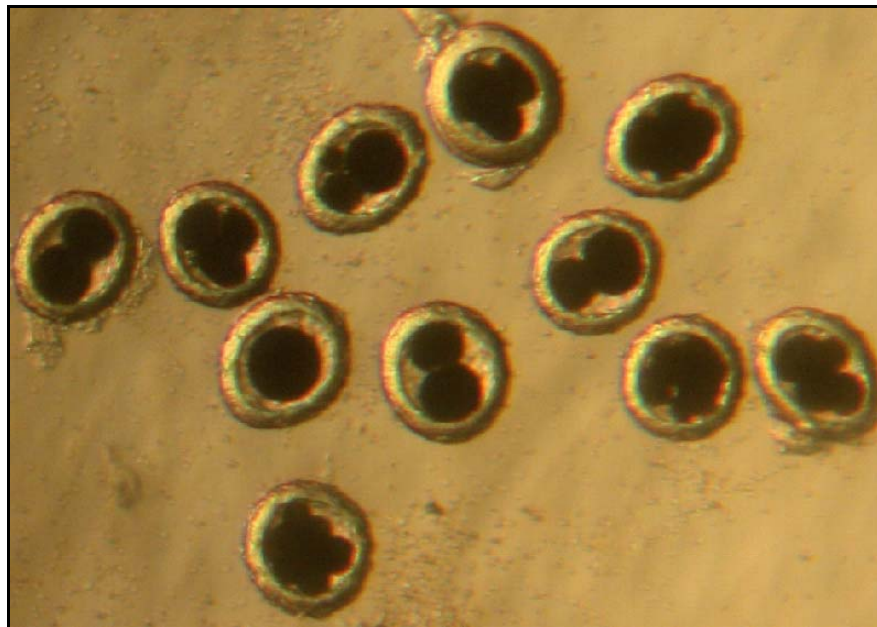


Figura N° 6: Ova recuperadas 19 días después de la administración de HCG. Se observan ova de 1, 2, 4 y 8 células.

6.- DISCUSIÓN

6.1.- ANÁLISIS DEL SEMEN FRESCO

De 4 perros disponibles, se obtuvo 10 eyaculados. Estos fueron recolectados a través de manipulación digital, obteniendo sólo la 1ª y 2ª fracciones, ya que la tercera sólo aporta volumen y dificulta el proceso de congelación. El 100% de los perros respondió a este procedimiento sin problemas, lo que concuerda con lo reportado por Rubilar (1999), quien trabajó con 5 perros, obteniendo 20 eyaculados a través de manipulación digital sin perra en celo.

En cuanto a las características macroscópicas registradas, el volumen obtenido de la 1ª y 2ª fracciones, varió en los 10 eyaculados de 1 a 4,5 ml, con un promedio de $2,4 \pm 0,9$ ml. Por su parte, Boucher y col. (1958), evaluaron 65 eyaculados de perros beagle, encontrando un volumen promedio para la primera fracción de 0,8 ml (rango de 0,25 a 2,8 ml), y para la segunda fracción de 0,6 ml (rango de 0,4 a 2ml). Rubilar (1999), registró un volumen promedio de $1,9 \text{ ml} \pm 0,87 \text{ ml}$. Silva y col. (2003), reportaron un volumen promedio para la segunda fracción de $1,54 \pm 0,64$ ml, al trabajar con 12 perros de diferentes razas.

El color de los 10 eyaculados fue: blanco, en 8 eyaculados, blanco-opalescente en 1 y a blanco-amarillento en otro. Christiansen (1989) indica que la intensidad de la opacidad depende de la concentración, y Rubilar (1999), agrega que la variación de la concentración puede ser afectada por el volumen de la fracción preespermática recolectada.

El olor para cada especie es considerado como *sui generis*, y sólo puede ser reconocido por la experiencia (Díaz y Arancibia, 1971). En todas las muestras de este estudio el olor fue calificado como *sui generis*, con distintas intensidades en cada una de ellas.

Las características microscópicas evaluadas fueron la motilidad progresiva, los espermatozoides vivos, los espermatozoides normales, la concentración espermática y los espermatozoides totales.

El porcentaje de motilidad progresiva varió en los 6 eyaculados seleccionados para congelar entre un 70 y 80% con un promedio de $76,6 \pm 4,1$ %. Rota y col. (1995), trabajaron con 11 perros, de diferentes razas, obteniendo un promedio de motilidad progresiva similar ($78,6 \pm 13,6\%$). Por otro lado, England (1999), reportó un promedio de $70,2 \pm 13,6\%$, al trabajar con 65 perros de diferentes razas y Rubilar (1999), reportó un porcentaje de motilidad progresiva superior, con un promedio de $83,8 \pm 9,47$ %. Un porcentaje promedio mayor aún ($97,9 \pm 3,3\%$), obtuvieron Silva y col. (2003).

Oettlé (1993), por su parte, encontró diferencias significativas entre perros fértiles y subfértiles, con un promedio de motilidad progresiva del $75,6 \pm 15,2\%$ para los primeros y

57,2 ± 24,3% para los segundos. Los resultados de este estudio, fueron superiores a ambos valores, siendo superiores al 70%, reportado como normal para la especie (Feldman t Nelson, 2000).

El porcentaje de espermatozoides vivos de los 6 eyaculados fluctuó entre 79 y 84%, esto tomando en cuenta que en los eyaculados 3 y 4 no se pudo realizar el recuento de espermatozoides vivos/muertos por falla en la técnica de tinción. El promedio obtenido fue de 82,2 ± 2,3%, que fue mayor al 68,7 ± 17,2% reportado por England en 1999, pero menor al 91% reportado por England y Allen 1992. Por otro lado Rubilar (1999), obtuvo un promedio mayor a los anteriormente señalados con un 92 ± 4,7%

La concentración espermática obtenida en este estudio fluctuó entre 169.000 y 366.666 espermatozoides/mm³, con un promedio de 254.935 ± 762.000 espermatozoides/mm³, inferior a los 324.700 ± 188.562 espermatozoides/mm³, reportado por Rubilar en 1999 y a los 401.000 ± 200.800 espermatozoides/mm³, reportados por England el mismo año. Silva y col. (2003), por su parte, reportaron un promedio de 775.000 ± 187.200 espermatozoides/mm³.

En relación con el total de espermatozoides, en este estudio el resultado obtenido en los 6 eyaculados varió de 338 a 1,100 x 10⁶ espermatozoides totales, con un promedio de 733,3 ± 352,3 x 10⁶, similar a los 703,2 ± 464,4 x 10⁶ obtenido por England en 1999 y superior a lo reportado el mismo año por Rubilar, con un promedio de 597 ± 326,9 x 10⁶ espermatozoides totales. Sin embargo, todos se encuentran dentro del rango de 200 a más de 1000 x 10⁶ espermatozoides totales, considerado como normal para un perro adulto (Feldman y Nelson, 2000).

En este estudio, se obtuvo un promedio de espermatozoides normales de 81,4 ± 3,1% (rango de 77,5 a 85,5%), similar a lo reportado por Rubilar (1999), con un promedio de 83,5 ± 20,3% y al 81,7% obtenido por England y Allen en 1992. Por su parte Morton y Bruce (1989), describieron un promedio de 69,1 ± 22,1%, inferior a los resultados obtenidos en este trabajo.

Según su ubicación en el espermatozoide, las anormalidades de la cabeza variaron de un 3 a 4%, con un promedio de 3,5 ± 0,5%, las de la pieza intermedia variaron de 4,5 a 7,5%, con un promedio de 5,5 ± 0,7%, y las de la cola variaron de 6 a 14,5% con un promedio de 9,5 ± 4,9%. Sin embargo, Morton y Bruce (1989) y Rubilar (1999), reportan un mayor porcentaje de anormalidades de la pieza intermedia, seguidas por las anormalidades de la cabeza y cola.

Las anormalidades divididas en primarias y secundarias mostraron en este estudio un mayor predominio de las segundas, con un promedio de 15,1 ± 3,1%, sobre las primeras, con un promedio de 3,5 ± 0,5%. Del mismo modo, Silva y col. (2003), describen un mayor porcentaje de anormalidades secundarias (17,3 ± 7,4%) sobre las primarias (1 ± 0,8%), al trabajar con 12 perros de diferentes razas.

6.2.- ANÁLISIS DEL SEMEN CONGELADO

De los 6 eyaculados seleccionados para congelar, se obtuvo un total de 81 pajuelas, las cuales contenían entre, 28.100.000 y 61.100.000 espermatozoides.

El semen congelado fue evaluado en cuanto a su porcentaje de motilidad progresiva, presentándose un rango de entre 40 y 50%, con un promedio de $45,8 \pm 3,8\%$. Rubilar (1999), utilizando el mismo protocolo de congelación obtuvo resultados que variaron entre un 10 y un 70%. Linde-Forsberg y col. (1999), obtuvieron resultados post descongelación de 20 a 30% en 3 perros, de 40 a 50% en 27 perros y de 51 a 75% en 170 casos. Sin embargo, en este trabajo han sido utilizados diferentes diluyentes y velocidades de congelado y descongelado, lo que dificulta la comparación de los resultados obtenidos.

6.3.- RESPUESTA DE LAS PERRAS AL TRATAMIENTO CON HAP

Para evaluar la respuesta de las perras tratadas durante 10 días consecutivos con 20 mg de HAP, más una única dosis de 1000UI de HCG el día 11 del tratamiento, se realizaron día por medio, desde el día 0 del tratamiento, toma de muestras para citologías vaginales, para poder observar el incremento en el porcentaje de células superficiales, las que fueron del 0 % el día 0 y alcanzaron el 100% entre los días 10 y 14. Además se tomaron muestras de sangre, 6 veces durante el estudio, para medir las concentraciones plasmáticas de progesterona

Mediante citología vaginal se evaluó el inicio del proestro y estro, tomando el primer día de tratamiento con HAP como día 1 del estudio. El inicio del proestro se detectó por la secreción sanguinolenta y edema vulvar, y su aparición varió del día 4 al 8 de iniciado el tratamiento, con un promedio de $6,3 \pm 1,5$ días, con un porcentaje de células superficiales que fue de 59 a 78%, con un promedio de $67,5 \pm 6,9\%$. El estro se determinó cuando el 100% de las células vaginales encontradas mediante citología vaginal, fueron células superficiales, y se presentó entre los días 10 y 14 de iniciado el tratamiento, con un promedio de $11,3 \pm 1,6$ días. Bustamante (1987), en un estudio similar, reportó que el inicio del proestro en promedio se presentó a los $4,6 \pm 0,89$ días de iniciado el tratamiento con HAP, con un promedio de células superficiales del $59,2 \pm 21,26\%$, y el estro, se presentó en promedio a los $13,4 \pm 2,88$ días, con el 100% de las células superficiales. Godoy (1998), por su parte, reportó en 5 perras tratadas con HAP, el inicio promedio del proestro el día $4,6 \pm 0,8$, con un promedio de células superficiales del $59 \pm 7,3\%$ y para el estro un promedio de $19,4 \pm 1,2$ días, con un promedio de células superficiales del $82 \pm 9,7\%$. En general se puede apreciar que el proestro fue más corto de lo considerado normal para la especie (promedio 9 días). Este acortamiento podría explicarse, ya que en perras con celo inducido se produciría un mayor número de folículos en crecimiento, lo que produciría una mayor concentración de estrógenos plasmáticos, ocasionando la presentación del estro más temprano.

La diferencia en el tiempo de presentación de l proestro y estro en estos estudios puede deberse a que las concentraciones de gonadotrofinas en el HAP, fueron diferentes en los 3 casos.

Los resultados obtenidos en la medición de progesterona plasmática, en las 6 perras del estudio, obtenidas los días 0, 7, 11, 15, 17 y 20 muestran que los niveles más bajos se observaron el día 0 con un promedio de $0,3 \pm 0,8$ ng/ml, el día 7 el promedio fue de $2,7 \pm 1,8$ ng/ml, el día 11 de $8,3 \pm 6,3$ ng/ml, el día 15 de $18,4 \pm 10,1$ ng/ml, el día 17 de $19 \pm 8,5$ ng/ml y el día 20 con un promedio de $25 \pm 14,6$ ng/ml, se obtuvieron los niveles más altos. England y Concannon (2002), sugieren que las inseminaciones con semen congelados deben comenzar preferiblemente un día después de que los valores plasmáticos de progesterona excedan 8 a 10 ng/ml, lo que se relacionaría positivamente con lo que sucedió en este estudio, ya que las perras fueron inseminadas los días 15-16-17 de iniciado el tratamiento con HAP.

La respuesta ovárica al tratamiento con HAP no mostró mayores diferencias entre ovarios. En relación al peso, estos variaron de 1,26 a 3,92 grs en uno y de 1,41 a 3,51 grs en el otro, con promedios de $2,1 \pm 1$ y $1,9 \pm 1$ gr, respectivamente. El peso total para ambos ovarios tuvo un promedio de $3,9 \pm 1,9$ gr. En relación con estos resultados Bustamante (1987), tampoco obtuvo mayores diferencias entre ovarios reportando un peso promedio de $1,7 \pm 0,9$ y $1 \pm 0,2$, grs para cada ovario, con un peso total de $2,16 \pm 0,63$ grs en promedio, pero menores a los obtenidos en este estudio, estos resultados también podrían explicarse por las diferentes concentraciones de gonadotrofinas en los HAP.

El número de cuerpos lúteos en cada ovario tampoco mostró grandes diferencias, variando de 4 a 19 C.L en uno y de 4 a 16 C.L en el otro, con un promedio de $9,5 \pm 2,8$ y $9,8 \pm 4,8$ C.L, respectivamente. El número total de cuerpos lúteos tuvo un promedio de $19,3 \pm 7,5$. Bustamante (1987) y Godoy (1998), reportaron un número de C.L promedio superior a lo reportado en este estudio, con un promedio de 36,7 (rango de 11 a 55) y 25 C.L para cada ovario.

6.4.- RECUPERACIÓN DE OVA Y ESTADO DE DESARROLLO.

Luego del tratamiento hormonal, se procedió a la IA artificial intravaginal de las perras, con dosis diarias que contenían entre 84.300.000 y 183.000.000 de espermatozoides. Farstad (2000b), propone que el número mínimo total de espermatozoides para una inseminación con semen congelado puede variar de 100 a 200 millones. Sin embargo, se han obtenido gestaciones con un número menor de espermatozoides, al depositarlo directamente en el útero (Wilson, 1993), incluso con un número de 35 a 40 millones de espermatozoides si la inseminación se hace en el momento óptimo y si el semen una vez descongelado es de muy buena calidad (Farstad, 2000b).

La recuperación de ova sólo fue posible en 5 de las perras del estudio. En la perra N° 6, no se obtuvieron ova, sin embargo, es importante destacar que en esta perra el oviducto era de menor diámetro, por lo que fue muy difícil realizar el procedimiento para la recuperación de las ova.

Por otra parte en la perra N° 3 sólo fue posible la recuperación 3 de ova y 3 C.L, lo que no indica buena respuesta al tratamiento con HAP. Esto podría explicarse debido a la edad de

la perra (12 años), ya que según Feldman y Nelson (2000), la fertilidad parece declinar de manera progresiva una vez que la perra cumple 7 años de edad o más.

En relación a la cantidad de ova no fecundadas y fecundadas, se observó una diferencia según el día de ovariectomía, ya que en las perras ovariectomizadas el día 25, de 64 ova recuperadas, sólo 26 presentaban más de 1 célula, es decir, estaban fecundadas, lo que corresponde al 40%. En cambio en las perras ovariectomizadas entre los días 29 y 30, de las 40 ova recuperadas, 32 estaban fecundadas (80%). En síntesis de un total de 104 ova recuperadas entre los días 25 y 30 del estudio, 58 estaban fecundadas, lo que corresponde a un 55,7%. No se encontró bibliografía sobre porcentajes de fecundación en ovas recuperadas, utilizando IA, sin embargo, Farstad (2000c), reporta un porcentaje de nacimientos del 74% en zorros y perros, con inseminación intrauterina. England y Concannon (2002), reportan tasas de preñez del 60% al utilizar inseminación intrauterina. Por otro lado Linde Frosberg (2001), en un estudio realizado con 205 perras, utilizando semen fresco, refrigerado y congelado, reportó para este último, un porcentaje de nacimientos del 34,6% utilizando IA intravaginal y del 52% con IA intrauterina.

En relación al estado de desarrollo de las ova, no hubo gran diferencia en el número de células presentadas por ova, que para las perras 1, 2, 4 y 5 fue de 1-2-4-8 células, y sólo en la perra 3 fue de 1-2 células. La diferencia se presenta en el número de células por cada estado de desarrollo de las ova. En las perras ovariectomizadas el día 25 se obtuvo 38 ova de 1 célula (59,3%), 21 de 2 células (32,8%), 3 de 4 células (4,7%) y 2 de 8 células (3,1%). En las perras ovariectomizadas los días 29 y 30 se obtuvieron 8 ova de 1 célula (20%), 14 de 2 células (35%), 12 de 4 células (30%) y 6 de 8 células (15%). Por su parte, Bustamante (1987), recuperó un total de 95 ova de 1-2-4 células, en las perras tratadas con 20 mg/HAP y eutanasiadas entre los días 22 y 26 de iniciado el tratamiento, pero se debe tomar en cuenta que en este estudio las perras fueron cubiertas con monta natural y no inseminadas, como en el presente estudio.

Ahora bien, como sabemos, los ovocitos de la perra son ovulados en estado inmaduro, como ovocitos primarios, y no pueden ser fecundados inmediatamente. La fecundación sólo puede ocurrir después de la maduración del ovocito primario. En la mayoría de las especies la maduración ocurre previa a la ovulación, pero en la perra no se completa hasta por lo menos 48 horas después de la ovulación. La fecundación significa la fusión del pronúcleo masculino con el pronúcleo femenino del ovocito secundario maduro para formar el cigoto de 1 célula (England y Concannon, 2002). Estos autores señalan, que el espermatozoide puede penetrar al ovocito primario inmaduro en cualquier momento luego de la ovulación. En estos casos, el tiempo que demora la formación del pronúcleo masculino no se ha definido bien. Asimismo, en estos casos, el tiempo desde la subsiguiente maduración del ovocito hasta la culminación de la meiosis y la fusión de los pronúcleos, no se conoce.

Todo lo anteriormente señalado podría explicar el mayor número de ova de una célula, recuperadas de las perras ovariectomizadas el día 25, las que también podrían estar fecundadas, pero sin haber comenzado su división celular. Del mismo modo se explicaría que el número de células por ova haya sido similar en las perras ovariectomizadas los días

25, 29 y 30, ya que el comienzo de la división dependería del momento de la fecundación y del estado de desarrollo de los ovocitos.

7.- CONCLUSIONES

Es posible la congelación de semen de perro y obtener buenos resultados de motilidad después de congelado, previa selección de los eyaculados.

Es posible inducir estro y ovulación en perras con HAP y HCG.

Es posible inducir celos fértiles en perras.

El porcentaje de fecundación con semen congelado, mediante inseminación artificial intravaginal, en perras con celo inducido, es superior al 50% y puede alcanzar hasta el 90%.

El mayor número de ova divididas en las perras 4 y 5, en relación a las perras 1, 2 y 3, podría deberse a la diferencia en los días de recuperación, por lo que es posible que en el tiempo, alcancen igual porcentaje de fecundación.

8.- BIBLIOGRAFÍA

- ALLEN, E. 1993. Fertilidad Obstetricia Canina. Ed. Acribia, S.A., Zaragoza (España).
- AMANN, R. 1986. Reproductive physiology and endocrinology of the dog. En Morrow DA (ed): Current Therapy in Theriogenology. WD Saunders Co. Philadelphia.
- ANCHORDOGUY, T.J., A.S. RUDOLPH, J.F. CARPENTER, J.H. CROWE. 1987. Modes of Interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology* 24:324-331.
- ANDERSEN, K. 1975. Insemination with frozen dog semen based on a new insemination technique. *Zuchthygiene* 10:1-4.
- ANDERSEN, K. 1980. Artificial insemination and storage of canine semen. In Morrow D.A. Current Therapy in Theriogenology W.B Saunders. Philadelphia.
- ANTELO, R. 2001. Manejo del servicio e inseminación artificial en la perra. En: Medicina y biotecnología reproductiva de caninos y felinos. Facultad de Agricultura y Ciencias Veterinarias, Universidad Católica de Temuco, Temuco, Chile.
- ARAYA, J. 1995. Inducción de superovulación en murinos, ovinos y bovinos utilizando un Extracto Hipofisiario Equino (HAP). Tesis de Magister en Ciencias con Mención en Reproducción Animal, Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.
- ARTHUR, G., D. NOAKES, H. PEARSON. 1991. Reproducción y Obstetricia Veterinaria. 6^a Ed. Editorial Mc Graw-Hill. Interamericana. España.
- BADINAND, F., B. FONT, A. CHANTAL. 1990. Preparation conditionnement, conservation et utilization de la semence du chien en Insemination Artificielle. *Elev. et Insem.* 239: 3-15.
- BENESCH, F. 1965. Tratado de Obstetricia y Ginecología Veterinaria. Ed. Labor, S.A. Barcelona.
- BERGER, T. 1996. Fertilization in ungulates. *Anim. Reprod. Sci.* 42:351-360.
- BOLAND, M., L. KENNEDY, T. CROSBY, I. GORDON. 1981. Superovulation in the cow using PMSG or HAP. *Theriogenology* 13 (1):92.

- BOUCHER, J., R. FOOTE, R. KIRK. 1958. The evaluation of semen quality in the dog and the effects of frequency of ejaculation upon semen quality, libido, and depletion of sperm reserves. *Cornell Vet.* 48:67-86.
- BUSTAMANTE, J. 1987. Uso del Extracto Hipofisiario Equino (HAP), en la inducción de celo en la perras. Tesis, M.V., Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.
- CHAKRABORTY, P., W. SEAGER. 1986. Induction of Estrus. In small Animal Reproduction and Infertility. Ed. T. Bruke. Lea and Febiger, Philadelphia.
- CHRISTIANSEN, J. 1984. Reproduction in the Dog and Cat. Bailliere. Tindall. London.
- CHRISTIANSEN, J. 1989. Inseminación y Transferencia Embrionaria. En: Reproducción en el perro y en el gato. Editado por Inter.-Vet, Buenos Aires, Argentina.
- CONCANNON, P., W. HANSEL, W. VISEK. 1975. The ovarian cycle of the bitch: plasma estrogen, LH and progesterone. *Biol. Reprod.* 13: 112-121.
- CONCANNON, P. 1980. Effects of hypophysectomy and of LH administration on luteal phase plasma progesterone levels in the Beagle bitch. *J. Reprod. Fertil.* 58:407.
- CONCANNON, P. 1986. Increased LH Pulse Frecuency Associated with Termination of Anestrus During the Ovarian Cicle of the Dog. *Biol. Reprod.* 34:119.
- CONCANNON, P., B. DIGREGORIO. 1986. Canine Vaginal Citology. In Small Animal. Reproduction and Infertility. Ed. T. Burke. Lea and Febiger. Philadelphia.
- CONCANNON, P. 1987. The physiology of ovarian cycles, pregnancy and parturition in the domestic dog. *Proccedings of the Society for Theriogenology.* pp 49.
- CONCANNON, P., M. TEMPLE. 1989. Biology and Endocrinology of Ovulation, Pregnancy and Parturition in the Dog. *J. Reprod. Fert.* 39: 3-25.
- CROSBY, T., M. BOLAND, A. EL-KAMALI, I. GORDON. 1980. Superovulation in the ewe using HAP. *Theriogenology* 13 (1): 92.
- DE LOS REYES, M. 2002. Uso de la inseminación artificial en los perros. MEVEPA – Universidad de Chile. Concón. Chile, 15: 4-8.
- DENIS, R., C. MILANÉS, J. ARENCIBIA, O. DUVERGER, A. MOYA. 1992. Comparación de dos técnicas de tinción para determinar la morfología espermática en la especie canina. IX Jornada Científica del CIMA. pp. 55.

- DENIS, R., C. MILANES. 1999. Tecnología para la inseminación artificial en la especie canina. Revisión bibliográfica. *Rev. Cub. Repr. Anim.* 25(2): 1-19.
- DHAMI, A., K. SAHNI. 1993. Evaluation of different cooling rates, equilibration periods and diluents of effects on deep-freezing enzyme leakage and fertility of taurine bull spermatozoa. *Theriogenology* 40:1269-1280.
- DÍAZ, O., C. ARANCIBIA. 1971. Calificación de la fertilidad potencial de los animales domésticos. Santiago. Chile. Eds. Vera-Gianini.
- DOAK, R., S. HALL, H. DALE. 1967. Longevity of spermatozoa in reproductive tract of the bitch. *J. Reprod. Fert.* 13:51-58.
- EDWARDS, D. 1986. Immotile cilia síndrome-primary cilia dyskinesia in the dog. Proceedings of the American College of Veterinary Internal Medicine, Washington, DC. pp 1389.
- ENGLAND, G., W. ALLEN. 1989a. Ultrasonography and histological appearance of the canine ovary. *Vet. Rec.* 125: 555.
- ENGLAND, G., W. ALLEN. 1989b. Real time ultrasonic imaging of the ovary and uterus of the dog. *J. Reprod. Fertil.* 39: 91.
- ENGLAND, G., W. ALLEN. 1992. Factors affecting the viability of canine spermatozoa. I. Potential influences during processing for artificial insemination. *Theriogenology* 37(2):363-371.
- ENGLAND, G. 1999. Semen quality in dogs and the influence of a short-interval second ejaculation. *Theriogenology* 52: 981-986.
- ENGLAND, G., P. CONCANNON. 2002. Determinación del momento de apareamiento óptimo en la perra: consideraciones básicas. Disponible en http://www.ivis.org/advances/concannon/england2_es/chapter_frm.asp?LA=2. Consultado en julio del 2003.
- EVENSON, D., L. THOMPSON, L. JOST. 1994. Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility. *Theriogenology* 41:637-651.
- FARSTAD, W. 2000a. Cubrición e Inseminación Artificial en el a perro. En Manual de Reproducción y Neonatología en Pequeños Animales. Ed. Harcourt. Madrid.
- FARSTAD, W. 2000b. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. *Anim. Reprod. Sci.* 60: 375-387.

- FARSTAD, W. 2000c. Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology* 53:175-186.
- FELDMAN, E., R. NELSON. 2000. Endocrinología y Reproducción Canina y Felina. Ed. Inter.-Médica, S.A.I.C.I., Buenos Aires.
- FERGUSON, J., J. RENTONK, W. FARSTAD, A. DOUGLAS. 1989. Insemination of beagle bitches with frozen semen. *J. Reprod. Fert.* 39:293-298.
- FOOTE, R. 1964. Extenders for freezing dog semen. *Am. J. Vet. Res.* 25:37-39.
- FOOTE, R., H. ONUMA. 1970. Superovulación, ovum collection, culture and transfer. A review. *J. Diary. Sci.* 53: 1681-1692.
- FOOTE, R. 1975. Semen quality from the bull to the freezer and assessment. *Theriogenology* 3(6): 219-234.
- FOUGNER, J. 1989. Artificial insemination in fox breeding. *J. Reprod. Fert.* 39:317-323.
- GATICA, R. 1985. Hormonoterapia reproductiva. VII Jornadas Latinoamericanas de Buiatría. pp: 43.
- GOBELLO, C. 2001. Inducción del ciclo estral en la perra. En: Medicina y Biotecnología Reproductiva de caninos y felinos. Facultad de Agricultura y Ciencias Veterinarias, Universidad Católica de Temuco, Temuco, Chile.
- GOBELLO, C., Y. CORRADA. 2003. Reproducción canina I: características de la perra. Disponible en <http://www.novedadesenred.com/v2/pages/numero.asp?ArtID=1838#3> Consultado en septiembre del 2003.
- GILL, H., C. KAUFMAN, R. FOOTE, R. KIRK. 1970. Artificial insemination of beagles bitches with freshly collected, liquid-stored, and frozen-stored semen. *Am. J. Vet. Res.* 31:1807-1813.
- GODOY, R. 1998. Descripción clínica, citológica y ecográfica del celo inducido con extracto hipofisiario equino (HAP) en la perra. Tesis, M.V., Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.
- GORDON, I. 1982. Synchronization of estrus and superovulation in cattle. In: mammalian egg transfer. Ed. C.E. Adams. C.R.C. Press. Boca Raton. Florida.
- GRAHAM, E. 1978. Fundamentals of the preservation of spermatozoa. En the integrity of frozen spermatozoa. Proc. Conf. Natl. Acad. Sci. Washington, D.C.

- GUÉRIN, C. 1998. Artificial insemination in dogs. *Summa* 15: 9-18. Citado por Denis, R., C. Milanes. 1999. Tecnología para la inseminación artificial en la especie canina. Revisión bibliográfica. *Rev. Cub. Reprd. Anim.* 25(2): 1-19.
- HAFEZ, E. 1987. Conservación y criopreservación de gametos y embriones. En Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 5ª Ed. Interamericana McGraw – Hill, México.
- HAFEZ, E. 1996. Evaluación de semen. En Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 6ª Ed. Interamericana McGraw – Hill, México.
- HAMMERSTEDT, R. 1996. Evaluation of sperm quality: Identification of the subfertile male and courses of action. *Anim. Reprod. Sci.* 42:77-87.
- HARASYMAWYCZ, J., L. BALL, G. SEIDEL. 1976. Evaluation of bovine spermatozoal morphologic features after staining or fixation. *Am. J. Vet. Res.* 37:1053-1057.
- HARROP, A. 1960. Mating: Natural service and artificial insemination. In: Reproduction in the dog. London. England. Baillière, Tindall & Cox.
- HEAPE, H. 1987. Artificial insemination of mammals and the subsequent fertilisation or impregnation of their ova. *Proc. Royal Soc. London.*: 61:52-56. Citado por Farstad, W. 2000. Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology* 53:175-186.
- HEWITT, D., G. ENGLAND. 1998. An investigation of capacitation and the acrosome reaction in dog spermatozoa using a dual fluorescent staining technique. *Anim. Reprod. Sci.* 51(4):321-332.
- HOLST, A., R. PHEMISTER. 1975. Temporal Sequence of Events in the Estrous Cycle of the Bitch. *Am. J. Vet. Res.* 36:705-706.
- HUTCHISON, R. 1993. Vaginal & surgical intra-uterine deposition of semen. In: Proceedings of the Canine Theriogenology Short Course; 33-37.
- JEFFCOATE, I. 1999. Reproducción Canina. En Compendium de Reproducción Animal. Ed. Laboratorios Intervet, España.
- JOHNSTON, S. 1980. Diagnostic and therapeutic approach to infertility in the bitch, *JAVMA* 176:1335. Citado por Feldman, E., R. Nelson. 2000. Endocrinología y Reproducción Canina y Felina. Ed. Inter.-Médica, S.A.I.C.I., Buenos Aires.
- JOHNSTON, S. 1982. Canine theriogenology. *J. Theriogenology* 11:1. Citado por Feldman, E., R. Nelson. 2000. Endocrinología y Reproducción Canina y Felina. Ed. Inter.-Médica, S.A.I.C.I., Buenos Aires.

- JOHNSTON, S. 1991. Performing a complete canine semen evaluation in a small hospital. *Vet. Clin. North Am.* 21: 545.
- KELL, B., B. WEBSTER. 1990. Handbook of the laboratory diagnosis and treatment of infertility. C.R.C. Press, Boston M.A.
- KUSTRITZ, M. 2001. Uso de Kits comerciales para ensayos de hormona luteinizante y de progesterone en el manejo reproductivo canino. En: Recent Advances in Small Animal Reproduction. Disponible en www.ivis.org Consultado en junio del 2003.
- LINDE-FORSBERG, C., M. FORSBERG. 1989. Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. *J. Reprod. Fert.* 39: 299-310.
- LINDE-FORSBERG, C. 1995 Artificial insemination with fresh, chilled extended, and frozen-thawed semen in the dog. *Seminars in Vet Med Surg (Small Animal)*; 10:48-58.
- LINDE-FORSBERG, C., B. STRÖM HOLST, G. GOVETTE. 1999. Comparison of fertility data from vaginal vs. intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: A retrospective study. *Theriogenology* 52:11-23.
- LINDE-FORSBERG, C. 2001. Inseminación intra-uterina en el perro usando el catéter transcervical escandinavo y comparación con otros métodos. Disponible en http://www.ivis.org/advances/concannon/linde_es/chapter_frm.asp?LA=2 Consultado en Julio del 2003.
- LOCKSLEY, E., H. YANG, M. WALTERSON. 1988. Manifestations of cell damage after freezing and thawing. *Criobiology* 25:178-185.
- MAZUR, P. 1970. Criobiology: The freezing of biological systems. *Science* 168: 939-940.
- MAZUR, P. 1985. Basic concepts in freezing cells. En: Johnson, L.A. and Larsson, K. Deep Freezing of Boar Semen. Swed. University of Agriculture Sci., Uppsala, pp. 91-111.
- MERYMAN, H. 1971. Crioprotective agents. *Criobiology* 8: 173-183.
- MONNIAUX, D., D. CHUPIN, J. SAUMANDE. 1983. Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology* 19:55-81.
- MONNIAUX, D., J. MARIANA, W. GIBSON. 1984. Action of PMSG on follicular populations in the heifer. *J. Reprod. Fert.* 70:243-253.
- MOOR, R., L. CAHILL, F. STEWART. 1980. Ovarian stimulation or egg production as a limiting factor of egg transfer. In: IX International Congress on Animal Reproduction and A.I. Madrid – España.

- MOOR, R., T. KRUIP, D. GREEN. 1984. Intraovarian control of folliculogenesis: Limits to superovulation?. *Theriogenology* 21: 103-115.
- MOORE, N., J. SHELTON. 1964. Response of the ewe to a Horse Anterior Pituitary Extract. *Nature* 194: 1283-1284.
- MOORE, N. 1975. The control of time of Oestrus and ovulation and induction of superovulation in cattle. *Aust. J. agric. Res.* 26:295-304.
- MORTON, D., S. BRUCE. 1989. Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of semen in dogs. *J. reprod. Fertil.* 39:311-316.
- MURPHY, B., J. LUSSIER, R. PIERSON, R. MAPLETOFT. 1987. Superovulation in the cow. Proc. IX Congress on Animal Reproduction. Venado Tuerto.
- NISHIKAWA, Y. 1964. History and development of Artificial Insemination in the world. V Congress International and Fecundation Artificial. Collage of Agricultural. Japan.
- OETTLÉ, E. 1993. Sperm morphology and fertility in the dog. *J. Reprod. Fert.* 47:257-260.
- OKKENS, A., M. BEVERS, S. DIELEMAN. 1985. Shortening of the interestrus interval and the lifespan of the corpus luteum of the cyclic dog by bromocriptine treatment. *Vet. Quar.* 7:173-176.
- OKKENS, A. 1985a. Evidence for non-involvement of the uterus in the lifespan of the corpus luteum in the cyclic dog. *Vet. Quar.* 7:169.
- OKKENS, A. 1985b. Shortening of the interestrus interval and the lifespan of the corpus luteum of the cyclic dog by bromocriptine treatment. *Vet. Quar.* 7:173
- OLSON, P. 1982. Concentrations of reproductive hormones in canine serum throughout late anestrus, proestrus and estrus. *Bilog. Rerod*, 27: 1196.
- OLSON, P. 1983. Infertility in the bitch. En Kirk (ed): Current Veterinary Therapy VIII. W.B. Saunders Co. Philadelphia.
- OLSON, P. 1984b. Concentration of testosterone in canine serum during late anestrus, proestrus, estrus and early diestrus. *Am. J. Res.* 45: 145.
- OLSON, P. 1984c. Vaginal cytology. Part I. A useful tool for staging the canine estrus cycle. *Comp. Cont. Ed. Pract. Vet.* 6: 288.
- OLSON, P. 1989. Exfoliative cytology of the canine reproductive tract. Proceedings of the Society for Theriogenology. pp 259.

- PARKINSON, T., C. WHITFIELD. 1987. Optimization of freezing conditions for bovine spermatozoa. *Theriogenology* 27:781-797.
- PAZOS, J. 2002. Tipos de inseminación artificial. Disponible en <http://www.dominiodelospenates.com/articulo7.htm>. Consultado en marzo del 2003.
- PINEDA, M. 1984. Endocrinología Veterinaria y Reproducción. Ed. Interamericana. Mc Graw-Hill. México.
- PURSEL, V., L. JOHNSON, G. RAMPACEK. 1992. Acrosome morphology boar spermatozoa incubated before cold shock. *J. Anim. Sci.* 34:278-283.
- QUINN, P., P. CHOW, Y. WHITE. 1980. Evidence that phospholipids protects ram spermatozoa from cold shock at plasma membrane sites. *J. Reprod. Fert.* 60: 403-407.
- ROBERTS, S. 1971. Veterinary Obstetrics and Genital Diseases. Ithaca, New York.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., H. EKWALL, C. LINDE-FROSBERG. 1993. Fine structure and elemental composition of fresh and frozen spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 47: 279-285.
- ROTA, A., B. STRÖM, C. LINDE-FROSBERG. 1995. Effects of seminal plasma and three extender on canine semen stored at 4°C. *Theriogenology* 44:884-900.
- RUBILAR, J. 1999. Evaluación de la fertilidad potencial de semen congelado canino. Tesis, M.V., Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.
- SAACKE, R., S. NADIR, R. NEBEL. 1994. Relationship of semen quality to sperm transport, fertilization and embryo quality in ruminants. *Theriogenology* 41:45-50.
- SALAS, F. 1984. Inducción de Superovulación en Cabras. Tesis, M.V., Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Valdivia, Chile.
- SANCHEZ, A. 1998. Inseminación artificial en perros. IV Curso Internacional de Medicina y Cirugía en Pequeños Animales. MEVEPA – Universidad de Chile. Concón. Chile, pp. 122-131.
- SCARRESI, I., J. CORREA, R. GATICA. 1984. Inducción de Ovulación en terneras. *Arch. Méd. Vet.* 16(2):99-101.
- SEAGER, S. 1969. Successful pregnancies utilizing frozen dog semen. *AI Digest.* 17:6-7.
- SEIDEL, G., S. SEIDEL. 1982. The embryo transfer industry. In: New Technologies in Animal Breeding. Eds. B.G. Brackett, G. E. Seidel, Jr. and S.M. Seidel. Academic Press, New York.

- SHUTTE, A. 1967. Canine vaginal cytology II. Cyclic changes. *J. Small Anim. Pract.* 8:307-311.
- SILVA, L., K. ONCLIN, F. SNAPS, J. VERSTEGEN. 1995. Laparoscopic intrauterine insemination in the bitch. *Theriogenology* 43:615-623.
- SILVA, A., R. CARDOSO, D. UCHOA, L. SILVA. 2003. Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. *Theriogenology* 59:821-829.
- SMITH F., E. GRAHAM. 1984. Cryopreservation of canine semen: Technique and performance. In: Proceedings of the Xth Int Congr Anim Reprod and AI, 2:216.
- STABENFELDT, G., V. SHILLE. 1977. Reproduction in the dog and cat. En Cole, H.H y P.T. Cupps, Reproduction in domestics mammals. 3^a ed. New York, academic Press.
- TSUTSUI, T. 1989. Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. *Reprod. Fert.* 39:169-175.
- VERSTEGER, J., K. ONCLIN, L. SILVA, P. CONCANNON. 1997. Termination of Obligate Anoestrus and Induction of Fertile ovarian Cycle in Dogs by Administration of Purified pig LH. *J. Reprod. And Fert.* 111:35-40.
- WALLACE, S., M. MAHAFFEY, D. MILLER, P. THOMPSON, P. CHAKRABORTY. 1992. Ultrasonographic Appearance of the Ovaries of Dogs during the Follicular and Luteal Phases of the Estrus cycle. *Am. J. Vet. Res.* 53:209-215.
- WILDT, D., P. CHAKRABORTY, W. PANKO, S. SEAGER. 1978. Relationship of Reproductive Behavior, Serum LH and Time of Ovulation in the Bitch. *Biol. Reprod.* 18: 561-570.
- WILSON, M. 1993. Non-surgical intrauterine artificial insemination in the bitch using frozen semen. *J. Reprod. Fert.* 47:307-317.
- YANAGIMACHI, R. 1994. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote* 2:371-372.
- YUBI, A., J. FERGUSON, J. RENTON, S. HARKER, M. HARVEY, B. BAGYENJI, T. DOUGLAS. 1987. Some observations on the dilution, cooling and freezing of canine semen. *J. Small Anim. Pract.* 28:753-761.
- ZALEWSKY, W., K. ANDERSEN. 1983. Acrosomal damage caused by processing of frozen semen. From the silver fox and the blue fox. *Zuchthygiene* 18:22-26.

9.- ANEXOS

ANEXO 1:

Preparación del Extracto Hipofisiario Equino (HAP), descrito por Moore y Shelton (1964).

- 1.- Recolección y congelación de hipófisis equinas.
- 2.- Trituración y homogenización de las hipófisis congeladas en una solución de cloruro de sodio al 2%, en proporción de 4 ml. de solución por gramo de hipófisis.
- 3.- Centrifugación del homogenizado a 1500 rpm. por 20 min.
- 4.- El sobrenadante es filtrado a través de lana de vidrio y se determina de su volumen (reservar).
- 5.- Resuspensión del residuo en cloruro de sodio y nueva centrifugación.
- 6.- Filtración del sobrenadante a través de lana de vidrio y determinación de volumen.
- 7.- Eliminación del residuo resultante.
- 8.- Adición al sobrenadante de 4,2 volúmenes de alcohol de 96° y mantención en reposo hasta el día siguiente a temperatura de refrigeración.
- 9.- Filtración a través de género en matraz kitasato conectado a un sistema de vacío y posterior lavado del precipitado obtenido, primero con alcohol de 96° y luego con éter.
- 10.- Secado del precipitado en campana de vidrio al vacío conteniendo en su interior silica gel.
- 11.- Remoción, pesaje y molido del precipitado y posterior almacenamiento a temperatura de refrigeración.
- 12.- Resuspensión previo a su uso en agua destilada estéril o en suero fisiológico estéril.

La efectividad del extracto fue probada, previo a ser utilizado en las perras, en ratones Rockefeller. Para esto se utilizaron seis hembras prepúberes de entre 20 y 23 días de edad, las cuales fueron divididas en 3 grupos (de 2 hembras cada uno). El primer grupo se utilizó como control, al segundo grupo se le inyectó 6mg de HAP, intraperitoneal (IP), en 2 dosis de 3mg, y

finalmente al tercer grupo se le inyectó una dosis única de 7,5mg de HAP, IP. 45 horas después de la primera inyección de HAP se les inyectó a las hembras 5 UI de HCG vía IP y se juntaron con un macho adulto, mayor a 80 días. A las 48 horas después las hembras fueron sacrificadas para extraer útero y ovarios lo cuales fueron pesados, observándose un incremento en el peso de útero/ovarios del 260% en el primer grupo y del 240% en el segundo (Cuadro 2).

Cuadro 2: Resultados con relación al peso del animal (gr), y al peso de útero/ovarios (mg), en las 2 hembras del grupo control y en las 4 tratadas con HAP, para probar su efectividad.

| HAP | Peso | | |
|----------|-------------|-------------------|----|
| | animal (gr) | Útero/ovarios(mg) | X |
| 0 mg. | 12,24 | 20 | 25 |
| 0 mg | 10,77 | 30 | |
| 3 mg x 2 | 13,25 | 70 | 65 |
| 3 mg x 2 | 13,63 | 60 | |
| 7,5 mg | 10,80 | 50 | 60 |
| 7,5 mg | 12,81 | 70 | |

Con esto se comprobó la eficiencia de la HAP preparada según el método descrito por Moore y Shelton (1964).

ANEXO 2:**DILUYENTE**

TRIS (Solución madre).

| | |
|-----------------------------------|-----------|
| TRIS (hydroxymethyl) aminomrthane | 3,29 g. |
| Ácido cítrico monohidratado | 1,704 g. |
| Fructosa | 1,36 g. |
| Estreptomicina | 0,10 g. |
| Penicilina | 0,10 mg. |
| Agua destilada estéril csp. | 100 ml. |
| Osmolaridad | 340 mOsm. |
| pH | 7,5. |

SOLUCIÓN DE TRABAJO

| | |
|-------------------|--------|
| TRIS (Sol. Madre) | 40 ml. |
| Glicerina | 4 ml. |
| Yema de huevo | 10 ml. |
| Vol. Total. | 50 ml. |

ANEXO 3:**EVALUACIÓN DEL SEMEN****FICHA DE RESULTADOS**

N° DADOR: A

NOMBRE: Trevo

NOMBRE DEL PROPIETARIO:
Eduardo Jaramillo

DIRECCION: Granja canina "Río Pichoy"

RAZA: Labrador Retriever.

FECHA NAC.: 15 diciembre, 1999

COLOR: Negro.

CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DEL EYACULADO

| N° EYACULADO | VOLUMEN (ml) | COLOR | OLOR |
|--------------|--------------|--------|-------------|
| 01 | 1,5 | Blanco | Sui generis |
| 05 | 1 | Blanco | Sui generis |

CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS ENCONTRADAS EN EL EYACULADO

| N° EYAC. | SEMEN FRESCO | | | | | |
|----------|--------------|----------|---------|------|--------------------------|---------------|
| | % MP. | % VIVOS. | % NORM. | VEL. | CONC. (mm ³) | ESP. TOT/EYA. |
| 01 | 35 | --- | --- | --- | --- | --- |
| 05 | 60 | 78 | 75 | 3-4 | 345.000 | 345.000.000 |

| N° EYAC. | SEMEN CONGELADO | | | |
|----------|-----------------|----------------|-------------|------|
| | N° DOSIS | PROP. DILUCION | CONC./DOSIS | % MP |
| 01 | --- | --- | --- | --- |
| 05 | 6 | 1:2 | 57.500.000 | 5 |

MP: Motilidad progresiva; NOR: Normales; CONC: Concentración; VEL.: Velocidad**ESP. TOT/EYA: Espermatozoides totales /eyaculado.****OBSERVACIONES:**

Pocos espermatozoides y en su mayoría muertos, con muchas células descamativas.

MP post descongelación muy baja, por lo tanto, no se utilizó en el estudio.

FICHA DE RESULTADOS

N° DADOR: B

NOMBRE: Lekker

NOMBRE DEL PROPIETARIO:
Eduardo Jaramillo

DIRECCION: Granja canina "Río Pichoy"

RAZA: Labrador Retriever

FECHA NAC.: 5 julio, 1997

COLOR: Negro

CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DEL EYACULADO

| N° EYACULADO | VOLUMEN (ML) | COLOR | OLOR |
|--------------|--------------|--------|-------------|
| 02 | 2 | Blanco | Sui generis |
| 07 | 2,5 | Blanco | Sui generis |

CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS ENCONTRADAS EN EL EYACULADO

| N° EYAC. | SEMEN FRESCO | | | | | |
|----------|--------------|----------|---------|------|--------------------------|---------------|
| | % MP. | % VIVOS. | % NORM. | VEL. | CONC. (mm ³) | ESP. TOT/EYA. |
| 02 | 60 | --- | 83,5 | 3 | 378.700 | 757.400.000 |
| 07 | 60 | 71,7 | 82,7 | 4 | 155.200 | 388.000.000 |

| N° EYAC. | SEMEN CONGELADO | | | |
|----------|-----------------|----------------|-------------|------|
| | N° DOSIS | PROP. DILUCION | CONC./DOSIS | % MP |
| 02 | 10 | 1:2 | 63.116.666 | 35 |
| 07 | 10 | 1:2 | 25.866.666 | S/M |

MP: Motilidad progresiva; NOR: Normales; CONC: Concentración; VEL.: Velocidad

ESP. TOT/EYA: Espermatozoides totales /eyaculado.

OBSERVACIONES:

Debido a la baja motilidad post- descongelación no se utilizó en el estudio.

FICHA DE RESULTADOS

Nº DADOR: C
 NOMBRE: Keule
 NOMBRE DEL PROPIETARIO: Eduardo
 Jaramillo

DIRECCION: Granja canina "Río Pichoy"
 RAZA: Chesapeake
 FECHA NAC.: 15 noviembre 1999
 COLOR: Chocolate

CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DEL EYACULADO

| Nº EYACULADO | VOLUMEN (ML) | COLOR | OLOR |
|--------------|--------------|--------------------|-------------|
| 03 | 3 | Blanco | Sui generis |
| 06 | 4 | Blanco-opalescente | Sui generis |
| 09 | 3,5 | Blanco | Sui generis |

CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS ENCONTRADAS EN EL EYACULADO

| Nº EYAC. | SEMEN FRESCO | | | | | |
|----------|--------------|----------|---------|------|--------------------------|---------------|
| | % MP. | % VIVOS. | % NORM. | VEL. | CONC. (mm ³) | ESP. TOT/EYA. |
| 03 | 70 | --- | 83,5 | 5 | 366.666 | 1.100.000.000 |
| 06 | 75 | 83,7 | 79,5 | 5 | 250.000 | 1.000.000.000 |
| 09 | 80 | 82,8 | 83,5 | 5 | 257.142 | 900.000.000 |

| Nº EYAC. | SEMEN CONGELADO | | | |
|----------|-----------------|----------------|-------------|------|
| | Nº DOSIS | PROP. DILUCION | CONC./DOSIS | % MP |
| 03 | 16 | 1:2 | 61.000.000 | 50 |
| 06 | 18 | 1:2 | 41.666.000 | 50 |
| 09 | 20 | 1:2 | 42.857.142 | 45 |

MP: Motilidad progresiva; NOR: Normales; CONC: Concentración; VEL.: Velocidad
 ESP. TOT/EYA: Espermatozoides totales /eyaculado.

FICHA DE RESULTADOS

N° DADOR: D
 NOMBRE: Pal
 NOMBRE DEL PROPIETARIO: Eduardo
 Jaramillo

DIRECCION: Granja canina "Río Pichoy"
 RAZA: Pastor Belga Terveuren
 EDAD: 15 diciembre 1996.
 COLOR: Negro-café

CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DEL EYACULADO

| N° EYACULADO | VOLUMEN (ML) | COLOR | OLOR |
|--------------|--------------|--------------------|-------------|
| 04 | 2 | Blanco | Sui generis |
| 08 | 2 | Blanco | Sui generis |
| 10 | 2,5 | Blanco amarillento | Sui generis |

CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS ENCONTRADAS EN EL EYACULADO

| N° EYAC. | SEMEN FRESCO | | | | | |
|----------|--------------|----------|--------|------|--------------------------|---------------|
| | % MP. | % VIVOS. | % NOR. | VEL. | CONC. (mm ³) | ESP. TOT/EYA. |
| 04 | 80 | --- | 77,5 | 5 | 310.000 | 620.000.000 |
| 08 | 80 | 79 | 79 | 4 | 169.000 | 338.000.000 |
| 010 | 75 | 84 | 85,5 | 4 | 176.800 | 441.500.000 |

| N° EYAC. | SEMEN CONGELADO | | | |
|----------|-----------------|----------------|-------------|------|
| | N° DOSIS | PROP. DILUCION | CONC./DOSIS | % MP |
| 04 | 7 | 1:2 | 50.166.666 | 40 |
| 08 | 7 | 1:2 | 28.100.000 | 45 |
| 010 | 13 | 1:2 | 29.433.333 | 45 |

**MP: Motilidad progresiva; NOR: Normales; CONC: Concentración; VEL.: Velocidad
 ESP. TOT/EYA: Espermatozoides totales /eyaculado.**

ANEXO 4:

Cuadro 3: Evaluación según espermiograma convencional, de las características microscópicas de 6 eyaculados (1° y 2° fracciones), obtenidos por estimulación digital, de 4 perros.

| N° eyaculado | M.P (%) | Esperm. vivos (%) | Esperm. normales (%) | Concentración (esp/mm ³) | Esperm Totales/eyaculado (x 10 ⁶) |
|--------------|---------|-------------------|----------------------|--------------------------------------|---|
| 3 | 70 | * | 83,5 | 366.666 | 1.100 |
| 4 | 80 | * | 77,5 | 310.000 | 620 |
| 6 | 75 | 83,7 | 79,5 | 250.000 | 1.000 |
| 8 | 80 | 79 | 79 | 169.000 | 338 |
| 9 | 80 | 82,2 | 83,5 | 257.142 | 900 |
| 10 | 75 | 84 | 85,5 | 176.800 | 442 |
| X | 76,6 | 82,2 | 81,4 | 254.935 | 733.3 |
| D.E | ± 4,1 | ± 2,3 | ± 3,1 | ± 76.200 | ± 352.2 |

N: Número de eyaculados; X: Promedio; D.E: Desviación estándar; M.P: Motilidad progresiva; Esperm.: Espermatozoides

ANEXO 5:

Cuadro 4: Anormalidades agrupadas según la parte del espermatozoide en que se ubican: cabeza, pieza intermedia y cola, en 6 eyaculados (1° y 2° fracciones), de 2 perros.

| N° Eyaculado | Tipo de Anormalidad | | | | | | Espermatozoides Normales | |
|--------------|---------------------|-------|---------------|-------|-------|-------|--------------------------|-------|
| | Cabeza | | Pieza Inter.. | | Cola | | | |
| | N | % | N | % | N | % | N | % |
| 3 | 6 | 3 | 10 | 5 | 17 | 8,5 | 167 | 83,5 |
| 4 | 7 | 3,5 | 9 | 4,5 | 29 | 14,5 | 155 | 77,5 |
| 6 | 6 | 3 | 9 | 4,5 | 26 | 13 | 159 | 79,5 |
| 8 | 8 | 4 | 15 | 7,5 | 19 | 9,5 | 158 | 79 |
| 9 | 8 | 4 | 12 | 6 | 13 | 6,5 | 167 | 83,5 |
| 10 | 7 | 3,5 | 11 | 5,5 | 12 | 6 | 170 | 85,5 |
| X | 7 | 3,5 | 11 | 5,5 | 19,2 | 9,6 | 162,7 | 81,4 |
| D.E | ± 0,8 | ± 0,5 | ± 2,2 | ± 0,7 | ± 6,8 | ± 4,9 | ± 6,1 | ± 3,1 |

Pieza Inter.: pieza intermedia; X: Promedio; D.E: desviación estándar.

ANEXO 6:

Cuadro 5: Porcentaje de malformaciones primarias y secundarias, en relación a los espermatozoides normales, en 6 eyaculados (1° y 2° fracciones), de 2 perros.

| N° Eyaculado | Características morfológicas (%) | | |
|-----------------|----------------------------------|------------------|--------------------|
| | Esp. Normales | Anorm. primarias | Anorm. Secundarias |
| 3 | 83,5 | 3 | 13,5 |
| 4 | 77,5 | 3,5 | 19 |
| 6 | 79,5 | 3 | 17,5 |
| 8 | 79 | 4 | 17 |
| 9 | 83,5 | 4 | 12,5 |
| 10 | 85,5 | 3,5 | 11 |
| X | 81,4 | 3,5 | 15,1 |
| D.E | ± 3,1 | ± 0,5 | ± 3,1 |

Esp: espermatozoides; X: Promedio; D.E: desviación estándar.

Cuadro 6: Malformaciones primarias, encontradas en los 6 eyaculados (1° y 2° fracciones), de 2 perros.

| N° Eyaculado | 3 | 4 | 6 | 8 | 9 | 10 | Total |
|-------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| Cabeza | | | | | | | |
| Microcefalia | | 2 | | 2 | | | 4 |
| Cuello | | | | | | | |
| Desprendido | 2 | | | 2 | 1 | | 5 |
| Paraaxial | | | 6 | 1 | 6 | 3 | 16 |
| Retroaxial | 1 | 5 | | | 1 | 1 | 8 |
| Abaaxial | 3 | | | | | | 3 |
| Con gota citoplasmática | | | | 3 | | 2 | 5 |
| Total | 6 | 7 | 6 | 8 | 8 | 6 | 41 |

Cuadro 7: Malformaciones secundarias, encontradas en los 6 eyaculados (1° y 2° fracciones), de 2 perros.

| N° Eyaculado | 3 | 4 | 6 | 8 | 9 | 10 | Total |
|--------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|--------------|
| Tracto Intermedio | | | | | | | |
| Quebrada | 4 | | 5 | 9 | 10 | 3 | 31 |
| Con gota citoplasmática | 6 | 9 | 4 | 6 | 2 | 8 | 35 |
| Tracto principal/terminal | | | | | | | |
| Llave de sol con gota citoplasmática | 3 | 5 | | | | | 8 |
| Llave de sol | | 7 | 13 | 3 | 4 | 5 | 32 |
| Enrollado | 12 | 15 | 7 | 12 | 8 | 5 | 59 |
| Enrollado alrededor de la cabeza | 2 | 2 | 6 | 4 | 1 | 2 | 17 |
| Total | 27 | 38 | 35 | 34 | 25 | 23 | 182 |

ANEXO 7:

Cuadro 8: Evaluación de la motilidad progresiva post descongelación de 6 eyaculados (1° y 2° fracciones) de 2 perros, diluidos en TRIS-Fructosa, ácido cítrico, 20% (v/v) yema de huevo y 8% (v/v) de glicerol, congelados a -196°C , en nitrógeno líquido.

| N° Eyaculado | M.P (%) |
|---------------------|----------------|
| 3 | 50 |
| 4 | 40 |
| 6 | 50 |
| 8 | 45 |
| 9 | 45 |
| 10 | 45 |
| X | 45,8 |
| D.E | 3,8 |

X: Promedio; D.E: desviación estándar.

ANEXO 8:

Cuadro 9: Determinación mediante citología vaginal del inicio del proestro y estro en 6 perras (Día 1 = 1° día de tratamiento con HAP).

| Perra N° | Inicio proestro | | Inicio estro | |
|-------------|-----------------|-------------|--------------|-------|
| | Días | % C.S | días | % C.S |
| 1 | 8 | 59 | 12 | 100 |
| 2 | 6 | 78 | 10 | 100 |
| 3 | 4 | 62 | 10 | 100 |
| 4 | 6 | 72 | 12 | 100 |
| 5 | 6 | 65 | 10 | 100 |
| 6 | 8 | 69 | 14 | 100 |
| X | 6,3 | 67,5 | 11,3 | |
| D.E | ± 1,5 | ±6,9 | ± 1,6 | |

X: Promedio; D.E: desviación estándar.;
C.S: células superficiales.

ANEXO 9:

Cuadro 10: Porcentaje de células superficiales, obtenidos mediante citología vaginal, durante 18 días, en las 6 perras tratadas durante 10 días consecutivos con 20 mg de HAP, e inseminadas los días 15, 16 y 17 del estudio.

| Días | % Células Superficiales | | | | | |
|------|-------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | Perra N°1 | Perra N°2 | Perra N°3 | Perra N°4 | Perra N°5 | Perra N°6 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 0 | 0 | 26 | 20 | 5,5 | 0 |
| 4 | 2 | 34 | 62 | 40 | 30 | 20,5 |
| 6 | 23,5 | 78 | 66,5 | 72 | 65 | 50 |
| 8 | 59 | 81 | 71,5 | 79 | 93 | 69 |
| 10 | 83 | 100 | 100 | 84,5 | 100 | 75 |
| 12 | 95 | 100 | 100 | 100 | 100 | 91,5 |
| 14 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

ANEXO 10:

Cuadro 11: Progesterona plasmática (ng/ml), medida, los días 0-7-11-15-17-20 de iniciado el tratamiento con HAP en las 6 perras del estudio.

| N° Perras | Días | | | | | |
|------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|---------------|
| | 0 | 7 | 11 | 15 | 17 | 20 |
| 1 | 0 | 2,9 | 4,7 | 21 | 23 | 30 |
| 2 | 0 | 1,7 | 7,9 | 30 | 29 | 52 |
| 3 | 0 | 5,3 | 3,8 | 9,6 | 8,5 | 13 |
| 4 | 0 | 0 | 1,6 | 6,9 | 10 | 13,5 |
| 5 | 0 | 2,9 | 18 | 13 | 17,5 | 22,5 |
| 6 | 2 | 3,3 | 13,5 | 30 | 26 | 19 |
| X | 0,3 | 2,7 | 8,3 | 18,4 | 19 | 25 |
| D.E | ± 0,8 | ± 1,8 | ± 6,3 | ± 10,1 | ± 8,5 | ± 14,6 |

X: Promedio; D.E: desviación estándar.

ANEXO 11:

Cuadro 12: Peso ovárico (gr) y número de cuerpos lúteos (C.L), en las 6 perras estudiadas.

| Perra N° | Ovario 1 | | Ovario 2 | | Peso Total (gr) | C.L. Totales |
|------------|------------|--------------|------------|--------------|-----------------|--------------|
| | Peso (gr) | C.L | Peso (gr) | C.L | | |
| 1 | 2,1 | 19 | 2,29 | 15 | 4,39 | 34 |
| 2 | 3,92 | 13 | 3,51 | 16 | 7,43 | 29 |
| 3 | 1,26 | 2 | 0,73 | 3 | 1,99 | 5 |
| 4 | 2,05 | 9 | 1,68 | 6 | 3,73 | 15 |
| 5 | 1,27 | 10 | 1,48 | 15 | 2,75 | 25 |
| 6 | 1,72 | 4 | 1,41 | 4 | 3,13 | 8 |
| X | 2,1 | 9,5 | 1,9 | 9,8 | 3,9 | 19,3 |
| D.E | ± 1 | ± 2,8 | ± 1 | ± 4,8 | ± 1,9 | ± 7,5 |

X: Promedio; D.E: desviación estándar; C.L: cuerpo lúteo.

ANEXO 12:

Cuadro 13: Determinación de ova fecundadas y no fecundadas en 5 de las perras estudiadas.

| Perra N° | Ova | | | | |
|-------------|---------------|---------------|--------------|---------------|---------------|
| | No Fecundadas | | Fecundadas | | Total |
| | N | % | N | % | N |
| 1 | 20 | 58,8 | 14 | 41,2 | 34 |
| 2 | 16 | 59,3 | 11 | 40,7 | 27 |
| 3 | 2 | 66,7 | 1 | 33,3 | 3 |
| X | 12,7 | 61,6 | 8,7 | 38,4 | 21,3 |
| D.E | ± 9,5 | ± 4,4 | ± 6,8 | ± 4,4 | ± 16,3 |
| 4 | 1 | 7,7 | 12 | 92,3 | 13 |
| 5 | 7 | 26 | 20 | 74 | 27 |
| 6 | -- | -- | -- | -- | -- |
| X | 4 | 16,85 | 16 | 83,2 | 20 |
| D.E | ± 4,2 | ± 12,9 | ± 5,7 | ± 12,9 | ± 9,9 |
| X | 9,2 | 43,7 | 11,6 | 56,3 | 20,8 |
| D.E | ± 8,5 | ± 25,5 | ± 6,9 | ± 25,5 | ± 12,5 |

X: Promedio; D.E: desviación estándar.

ANEXO 13:

Cuadro 14: Día de ovariectomía, post inicio del tratamiento, número de ova recuperadas y su estado de desarrollo en las 6 perras estudiadas.

| Perra N° | Ovariohist. días | N° Ova | Estado desarrollo (células) |
|-------------|---------------------|---------------|--------------------------------|
| 1 | 25 | 34 | 1-2-4-8 |
| 2 | 25 | 27 | 1-2-4-8 |
| 3 | 25 | 3 | 1-2 |
| 4 | 29 | 13 | 1-2-4-8 |
| 5 | 30 | 27 | 1-2-4-8 |
| 6 | 31 | -- | -- |
| X | 27,5 | 20,8 | |
| D.E | ± 2,8 | ± 12,5 | |

X: Promedio; D.E: desviación estándar; Ovarihist: ovariectomía.

AGRADECIMIENTOS

En especial al Dr. Renato Gatica G., por darme la oportunidad de realizar este trabajo, brindándome su sabiduría y apoyo constantes.

Al Dr. Jorge Rubilar por su apoyo y paciencia durante toda la realización de este trabajo.

A mis padres, por su apoyo, paciencia y confianza incondicional, sin los cuales no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

A Claudio, por su ayuda y paciencia, siempre.

A Dante, Isabel, Paulo y Tina, por su paciencia, ayuda y preocupación.

A la Sra. Carmen Shüller por su cariño, ayuda y apoyo para lograr mi trabajo.

A todos los compañeros de pre y post grado que me apoyaron y aconsejaron durante este trabajo.

Al Dr. Hernán Aguilar, del Hospital veterinario de la Universidad Austral de Chile, por su ayuda en la cirugía de las perras utilizadas en esta memoria.

A mis amigas Soledad Jara, Sandra Nannig, Patricia Monckton, quienes siempre estuvieron ahí para ayudarme.

Al Dr. Eduardo Jaramillo, por su ayuda desinteresada, facilitándome los perros utilizados en este estudio.

A Don Fernando, auxiliar del Hospital veterinario de la Universidad Austral de Chile, por su ayuda y paciencia.

Y a todas las personas que de una u otra manera ayudaron en la realización de esta memoria.