

**CRIOCONSERVACIÓN Y  
VIABILIDAD ESPERMÁTICA EN LA  
ESPECIE CANINA: UTILIZACIÓN DE  
NITRÓGENO LÍQUIDO VS  
ULTRACONGELADOR DE – 152 °C**

**Universidad de Las Palmas de Gran Canaria**

**DESIREE ALAMO SANTANA**

**2007**

DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL, PRODUCCIÓN ANIMAL,  
BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

D. ANSELMO GRACIA MOLINA, CATEDRÁTICO DE UNIVERSIDAD, Y D. MIGUEL BATISTA ARTEAGA, PROFESOR TITULAR DE UNIVERSIDAD, DOCTORES EN VETERINARIA, ADSCRITOS AL DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL, PRODUCCIÓN ANIMAL, BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

INFORMAN:

Que D<sup>a</sup>. DESIRÉE ALAMO SANTANA, licenciada en Veterinaria, ha realizado bajo nuestra dirección el presente trabajo titulado “CRIOCONSERVACIÓN Y VIABILIDAD ESPERMÁTICA EN LA ESPECIE CANINA: UTILIZACIÓN DE NITRÓGENO LÍQUIDO VS ULTRACONGELADOR DE - 152 °C” y consideramos que reúne las condiciones y calidad científica necesarias para optar al grado de Doctor en Veterinaria por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

La doctoranda

Los directores

Fdo. Desirée Alamo Santana

Fdo. Anselmo Gracia Molina  
Fdo. Miguel Batista Arteaga

Las Palmas de Gran Canaria, a 5 de marzo de 2007

*A mi marido Miguel  
y a mis niños Daniel y Miriam,  
porque el mayor tesoro del mundo es tener  
a alguien a quien querer y que te quiera*

## AGRADECIMIENTOS

A mi director de Tesis Dr. D. Miguel Batista Arteaga por confiar en las grandes posibilidades que ofrecía este proyecto, coincidiendo conmigo en la idea de que en ciencia nunca está todo descubierto y cualquier trabajo es bueno si te dedicas a él con pasión.

A la Dra. Dña. Ana Isabel Peña Martínez de la Facultad de Veterinaria de Lugo por ayudarme a sentar las bases de este trabajo, enseñándome todo cuanto sabía sobre criopreservación de semen canino.

Al Dr. D. Alain Fontbonne de la Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort porque sin su inestimable participación mostrándome cómo realizar inseminaciones artificiales intrauterinas, hubiese resultado tremendamente difícil realizar las pruebas de fertilidad *in vivo*.

Al MECD por concederme una beca FPU que me ha permitido realizar con éxito esta tesis doctoral.

A la Familia Megías Martínez por escogerme como beneficiaria de una beca de investigación INNOVA, sin cuya contribución hubiese sido imposible llevar a cabo este proyecto, ya que gracias a ellos pudimos adquirir el número de ejemplares necesarios para realizar las pruebas *in vivo*.

A la Unidad de Reproducción y Obstetricia de la Facultad de Veterinaria de Las Palmas de Gran Canaria y a todos sus integrantes por permitirme pertenecer a su grupo, poniendo a mi alcance todos los medios necesarios para realizar este trabajo de investigación.

Al Albergue Insular de Animales por facilitarme obtener el número de donantes necesarios para la primera fase de este proyecto de investigación.

A mi amiga Noemí R.D. por darme siempre ánimos y confiar en mí. Además, debo agradecerle que me ayudase de forma totalmente desinteresada en la realización de los análisis de patrones hormonales (RIA), poniendo en su cara siempre una sonrisa aún cuando ella estaba agobiada con su propio trabajo.

A Melania S. C., colega y compañera inestimable donde las haya, ya que sin su dedicación y amor incondicional hacia los animales no hubiese sido posible este trabajo, debido principalmente a la gran labor realizada en la cría de los cachorros, además de deshacerse en cuidados con las madres.

A Guadalupe C. P. y Tara N. G. por su ayuda y colaboración en muchos momentos de estrés y falta de tiempo, porque estuvieron ahí en situaciones en las que para mí era imposible desdoblarme para abarcar más cosas.

A mi padre y a mi madre por el enorme sacrificio que han realizado para ayudarme a vencer todos los obstáculos que se han cruzado en mi camino durante este tiempo, mostrándome siempre su apoyo y su amor incondicional.

A mi familia ya que siempre he podido contar con ellos; en especial, a mi madre y mi hermano Pablo que me han ayudado muchísimo con mi hijo en momentos claves de este trabajo.

Finalmente a todos los animales que han formado parte de esta experiencia porque sin ellos no hubiese podido realizar este trabajo: Bono, Curco, Chuchito Clint, Moreno, Niebla, Rotti, Rubio, Vikingo y Tiger; y a nuestras beagles Blanca, Chiquita, Crisol, Lisa, Lula, Pepa, Taly y Trasto.

## INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1. Anatomía del aparato reproductor masculino en la especie canina.....	7
2.1.1. Testículos.....	7
2.1.2. Epidídimo.....	9
2.1.3. Cordón Espermático.....	9
2.1.4. Glándulas accesorias.....	10
2.1.4.1. Próstata.....	10
2.1.4.2. Ampolla.....	10
2.1.5. Uretra, pene y prepucio.....	11
2.1.5.1. Uretra.....	11
2.1.5.2. Pene.....	11
2.1.5.3. Prepucio.....	12
2.2. Gametogénesis en el perro.....	13
2.2.1. Espermatogénesis.....	13
2.2.2. Espermatocitogénesis.....	13
2.2.3. Espermiogénesis.....	14
2.2.4. Espermiación.....	14
2.2.5. Morfología del espermatozoide.....	14
2.2.6. Transporte del semen.....	15
2.3. Producción seminal en el perro.....	16
2.3.1. Métodos y frecuencia de recogida.....	16
2.3.1.1. Métodos.....	16
2.3.1.2. Frecuencia de recogida.....	19
2.3.2. Características del semen en la especie canina.....	20
2.3.2.1. Características macroscópicas.....	21
2.3.2.2. Características microscópicas.....	21
2.3.2.3. Características bioquímicas.....	28
2.3.3. Factores que influyen sobre las características seminales.....	29
2.3.3.1. Individuo y raza.....	29
2.3.3.2. Estado de ánimo y ambiente.....	29
2.3.3.3. Edad.....	30
2.3.3.4. Ritmo de recogida.....	30
2.4. Conservación del semen canino.....	31
2.4.1. Semen fresco.....	31
2.4.2. Semen refrigerado.....	31
2.4.3. Semen congelado.....	32
2.4.3.1. Contrastación y selección de eyaculados.....	33
2.4.3.2. Dilución de eyaculados.....	33
2.4.3.3. Proceso y tasa de dilución.....	36
2.4.3.4. Periodo de equilibración.....	37
2.4.3.5. Congelación en nitrógeno líquido.....	38
2.4.3.6. Congelación en ultracongeladores.....	39
2.4.4. Descongelación.....	40
2.4.4.1. Procedimiento.....	40
2.4.4.2. Contrastación del semen congelado-descongelado.....	40
2.4.4.3. Estimulación de la motilidad espermática post-descongelación.....	41
2.5. Inseminación artificial.....	42
2.5.1. Ventajas.....	42
2.5.2. Inconvenientes.....	42
2.5.3. Requisitos del semen.....	43
2.5.4. Técnica de inseminación artificial.....	43

2.5.4.1. Semen fresco.....	43
2.5.4.2. Semen congelado.....	45
2.6. Anatomía del aparato reproductor femenino en la especie canina.....	46
2.6.1. Vulva.....	46
2.6.2. Vagina.....	46
2.6.3. Útero.....	47
2.6.4. Ovarios.....	49
2.7. El ciclo estral de la perra.....	50
2.7.1. Pubertad.....	50
2.7.2. Ciclo estral.....	50
2.7.2.1. Proestro.....	51
2.7.2.2. Estro.....	52
2.7.2.3. Diestro.....	54
2.7.2.4. Anoestro.....	55
2.7.2.5. Modificaciones en la presentación de estros.....	56
2.8. Métodos de determinación del periodo de máxima fertilidad en la perra.....	57
2.8.1. Citología vaginal.....	57
2.8.2. Endoscopia vaginal.....	59
2.8.3. Determinación de concentraciones plasmáticas hormonales.....	60
2.8.4. Ecografía.....	62
2.8.5. Otros procedimientos.....	62
2.9. Tratamientos de inducción del celo y la ovulación en la especie canina.....	63
2.9.1. Tratamientos a base de gonadotropinas.....	63
2.9.2. Tratamientos mediante la utilización de antagonistas de la prolactina.....	65
2.9.3. Tratamientos a base de la administración de GnRH o agonistas de GnRH.....	66
2.9.4. Tratamientos a base de estrógenos.....	67
2.10. Gestación y su diagnóstico en la perra.....	69
2.10.1. Endocrinología de la gestación.....	69
2.10.2. Diagnóstico de gestación.....	70
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	73
3.1. Valoración de la calidad seminal <i>in vitro</i> .....	74
3.1.1. Animales.....	74
3.1.2. Estado sanitario, alimentación y alojamiento.....	74
3.1.3. Planificación del trabajo experimental.....	75
3.1.4. Recogida seminal.....	77
3.1.5. Contrastación seminal.....	78
3.1.5.1. Pruebas macroscópicas.....	78
3.1.5.2. Pruebas microscópicas.....	78
3.1.6. Procedimientos de diluyoconservación seminal.....	82
3.1.7. Protocolos de congelación y conservación seminal.....	85
3.1.7.1. Congelación en nitrógeno líquido (NL).....	85
3.1.7.2. Congelación en ultracongelador de -152 °C (ULF).....	85
3.1.8. Descongelación y valoración de la calidad seminal post-descongelación.....	86
3.1.9. Análisis estadístico.....	87
3.2. Inducción del celo, inseminación artificial y tasa de fertilidad.....	90
3.2.1. Animales.....	90
3.2.1.1. Hembras.....	90
3.2.1.2. Machos.....	91
3.2.2. Planificación del trabajo experimental.....	91
3.2.3. Recogida, contrastación y crioconservación de las muestras seminales.....	93
3.2.4. Tratamiento de inducción del celo y la ovulación.....	94
3.2.5. Extracción, tinción e interpretación de las citologías vaginales.....	95
3.2.6. Extracción de muestras sanguíneas.....	96

3.2.7. Momento y procedimiento de la inseminación artificial.....	97
3.2.8. Determinación de los niveles plasmáticos de progesterona.....	101
3.2.9. Diagnóstico de gestación.....	102
3.2.10. Parto y tamaño de la camada.....	102
3.2.11. Análisis estadístico.....	103
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>104</b>
4.1 Calidad seminal <i>in vitro</i> .....	105
4.1.1. Características del semen fresco previo a las congelaciones.....	105
4.1.2. Calidad seminal post-descongelación a lo largo del periodo experimental.....	108
4.1.2.1. Motilidad espermática post-descongelación en los diferentes procedimientos de crioconservación	108
4.1.2.2. Comparación de la motilidad individual progresiva entre los diferentes ejemplares	112
4.1.2.3. Progresión de la motilidad espermática post-descongelación a lo largo del tiempo	116
4.1.2.4. Vitalidad espermática post-descongelación en los diferentes procedimientos de crioconservación	127
4.1.2.5. Porcentaje de acrosomías post-descongelación en los distintos protocolos de criopreservación	133
4.1.2.6. Porcentaje de morfoanomalías post-descongelación en los diferentes protocolos de crioconservación	138
4.2. Inducción del celo, citología vaginal, niveles plasmáticos de progesterona y tasa de fertilidad post-inseminación...	143
4.2.1. Tratamiento de inducción del celo.....	143
4.2.2. Evolución de la citología vaginal durante el periodo experimental.....	143
4.2.2.1. Características de la citología vaginal durante el periodo de inducción del tratamiento	143
4.2.2.2. Características de la citología vaginal durante el periodo de proestro, estro y primeros días del diestro	145
4.2.3. Niveles plasmáticos de progesterona durante el tratamiento de inducción, proestro, estro y diestros inducidos.....	154
4.2.4. Calidad del semen post-descongelación y procedimiento de inseminación.....	166
4.2.5. Tasa de fertilidad y tamaño de la camada.....	167
4.2.6. Relación entre citología vaginal, niveles plasmáticos de progesterona, tasa de fertilidad y prolificidad.....	168
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>170</b>
5.1. Calidad seminal <i>in vitro</i> .....	171
5.1.1. Características seminales en fresco.....	171
5.1.2. Características seminales post-descongelación.....	173
5.1.2.1. Motilidad espermática post-descongelación	173
5.1.2.2. Motilidad espermática post-descongelación: variabilidad individual	178
5.1.2.3. Vitalidad espermática post-descongelación	179
5.1.2.4. Porcentaje de acrosomías post-descongelación	181
5.1.2.5. Porcentaje de morfoanomalías post-descongelación	182
5.1.3. Valoración global de los protocolos de congelación, porcentaje de glicerol y la influencia individual post-descongelación.....	185
5.1.3.1. Valoración global de los protocolos de congelación	185
5.1.3.2. Valoración global del porcentaje de glicerol presente en el diluyente empleado	186
5.1.3.3. Valoración global de las diferencias entre los valores de los diferentes individuos	187
5.2. Inducción del celo, determinación del momento óptimo de inseminación y tasa de fertilidad post-inseminación.....	189
5.2.1. Tratamiento de inducción con cabergolina.....	189
5.2.2. Citología vaginal durante el tratamiento de inducción, proestro y estro inducidos.....	191
5.2.3. Niveles plasmáticos de progesterona desde el tratamiento de inducción hasta el periodo posterior a las inseminaciones.....	193
5.2.4. Inseminación artificial.....	195
5.2.4.1. Técnica de inseminación artificial	195
5.2.4.2. Momento de inseminación	196
5.2.5. Tasa de gestación y prolificidad final.....	198
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>201</b>
<b>7. RESUMEN.....</b>	<b>205</b>
<b>8. SUMMARY.....</b>	<b>210</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>214</b>

## 1. INTRODUCCIÓN



## 1. INTRODUCCIÓN

El perro de nuestros días tiene como ancestro al lobo y comenzó a formar parte de la vida del hombre hace aproximadamente unos 15.000 años, cuando por motivos alimenticios, se convirtió en carroñero del entorno que rodeaba los asentamientos humanos semipermanentes. De hecho, la hipótesis más probable sería que, hace unas 1.000 generaciones, los cánidos fueron capaces de observar todas las ventajas que les ofrecía vivir alrededor de los campamentos humanos y esto, unido a la sociabilidad de esta especie, les permitiera la supervivencia. Hace unos 12.000 años, el lobo doméstico evolucionó a un perro primitivo que, además de tener menor tamaño y mejor carácter, era más obediente y sociable. Los humanos destinaban estos perros primitivos para diversas funciones (protección de campamentos, colaboración en las cacerías y fuente de alimento cuando escaseaban las presas salvajes), con lo que la presencia de los perros comenzó a tomar importancia en las sociedades humanas (Fogle, 1996).

A lo largo de la historia, la especie canina ha representado un papel importante en la religión, arte, folklore y mitología de algunas culturas, como la China hace unos 4.000 años o la Persa hace unos 2.750 años. Los perros también se han utilizado como símbolo de diversas efemérides, siendo inicialmente los ejemplares destinados a la cacería símbolo de poder, riqueza y prestigio; luego pasaron a ser muy apreciados por la heráldica y, finalmente, comenzaron a formar parte de objetos decorativos. Como otros muchos animales, el perro ha sido muy apreciado como personaje literario, tanto adulto como infantil. Y, desde que el ser humano empezó a disponer de tiempo de ocio, la especie canina destacó por ser un gran entretenimiento para el público en general, tanto en circos, como cines..., además de formar parte de muchas actividades deportivas elegidas por el ser humano (Fogle, 1996).

Antiguamente, la principal función del perro era su uso como animal de trabajo, pero con la evolución que ha sufrido la sociedad moderna, este papel en la actualidad es secundario siendo su labor principal la de animal de compañía. Pero, a diferencia de otras especies domésticas, los perros poseen una gran inteligencia y, sobre todo, una enorme nobleza que lo convierte en una de las pocas especies animales capaces de desarrollar de una forma destacada funciones de guarda, defensa, rastreo, pastor, salvamento, guía o auxiliares, de tiro, de servicio social..., además de ser un animal enormemente valioso en concursos de pastoreo, pruebas de campo, *agility*, carreras de trineos o concursos de belleza. Todo ello, explica por sí sólo, cómo una especie que no genera los beneficios económicos que podría aportar un animal

de abasto, ha sido capaz de integrarse en la sociedad humana con tanto arraigo, aportando sobre todo afecto y compañía a una sociedad cada vez más independiente y estresada; por otro lado, no hay que olvidar los grandes beneficios económicos y de prestigio que supone la cría de ejemplares, que sobresalen por su belleza y habilidad en las diferentes modalidades de concursos caninos celebrados.

No existe ningún documento que explique fehacientemente cómo se introdujo el perro en las Islas Canarias. En un relato de Plinio el Viejo, se relata como Juba II (nombrado rey de Mauritania por el César en el año 20 a.C.) había logrado apresar dos perros de gran tamaño en las Islas Canarias; este documento se contradice con otros más recientes, donde dos monjes franceses que arribaron a Canarias con Jean de Bethencourt y Gadifer de la Salle en 1404, hacen referencia a la presencia en las Islas de perros salvajes parecidos a lobos, pero de tamaño más pequeño. De lo que no cabe ninguna duda es que en la actualidad, Canarias cuenta con un gran patrimonio en cuanto a variedad de razas caninas autóctonas se refiere; la única incógnita existente es su origen, ya que hay teorías que defienden la existencia de una serie de perros aborígenes que podrían haberse cruzado con perros de razas inglesas, españolas, francesas y portuguesas; y hay otras que afirman que las razas Canarias actuales son el resultado solamente de los cruces entre las razas de perros foráneos introducidos por los diferentes conquistadores (Curtó, 1991; Mora, 1996). Con independencia de todo lo anterior, lo que sí se puede afirmar es que en la actualidad la Comunidad Autónoma de Canarias es una de las que mayor variedad de razas caninas aporta a nuestro país: El Podenco Canario, El Dogo Canario, El Pastor Garafiano y El Perro Majorero.

Al ser un animal de compañía y, sobre todo, debido a su conformación anatómica, el método más usado para la reproducción de esta especie sigue siendo la monta natural; a pesar de ello, cada vez son más los propietarios que demandan la inseminación artificial como técnica de elección en la reproducción canina. Esta tendencia está tomando cada vez más auge, no sólo por el enorme valor económico y afectivo que muchos de estos canes representan para sus propietarios, sino también porque la enorme selección a la que han sido sometidas determinadas razas, impide muchas veces que ambos congéneres puedan acoplarse satisfactoriamente en una monta natural. Además, no se debe olvidar el hecho de que muchas veces ocurren problemas reproductivos que impiden la reproducción natural de unos ejemplares concretos entre sí, como por ejemplo falta de libido en el macho o monta dolorosa de la hembra (Thomas y cols., 1993; Silva y cols., 1996).

Por otro lado, es necesario indicar el notable crecimiento que están teniendo las técnicas de criopreservación seminal de ejemplares muy valiosos genéticamente, que permiten garantizar una mayor distribución espacial y temporal de la calidad genética del macho; de esta forma, se incrementa el número de hembras gestantes (y camadas) por un solo semental y, como consecuencia de ello, el rendimiento económico obtenido por estos propietarios se ve multiplicado al tener la posibilidad de vender el semen congelado. Finalmente, no debemos olvidar que existe un número cada vez mayor de propietarios que desean tener la posibilidad de obtener descendencia de su animal una vez que haya fallecido, no exclusivamente con criterios de productividad económica, sino simplemente (pero no menos importante) desde un punto de vista afectivo del hombre hacia su mascota.

La investigación que pretendemos realizar supone una continuación del trabajo anterior realizado con importantes expectativas en esta universidad, donde se demostró que existen métodos alternativos para la criopreservación seminal de la especie canina mediante el uso de ultracongeladores de  $-152\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Álamo, 2003). Hasta el momento de desarrollar este trabajo experimental, sólo nuestro grupo de investigación había llevado a cabo experiencias donde se valoraba la criopreservación de semen canino mediante el uso del ultracongelador de  $-152\text{ }^{\circ}\text{C}$ , si bien se ha tratado de estudios *in vitro* y a corto plazo. Por tanto, consideramos de interés prioritario comprobar la longevidad de la calidad seminal *in vitro* a más largo plazo, tras crioconservar semen mediante ultracongeladores de  $-152\text{ }^{\circ}\text{C}$ , así como su fertilidad real a la hora de garantizar una adecuada tasa de gestación. Además, sigue sin definirse un patrón idóneo de diluyo-conservación y congelación seminal, debido, entre otras razones, a las peculiaridades que presenta el semen de la especie canina; por otro lado, no se debe olvidar que la propia anatomía y fisiología reproductiva de la hembra representan una serie de complicaciones a la hora de obtener buenos resultados de fertilidad mediante el uso de semen congelado.

Asimismo, es necesario valorar que la inmensa mayoría de los estudios realizados de criopreservación seminal en la especie canina, utilizan un *pool* de semen para intentar establecer el mejor protocolo de congelación espermática; sin embargo, nosotros pretendemos también comprobar si existe variabilidad individual a la hora de congelar el semen de un ejemplar concreto frente a otro, utilizando una misma técnica de criopreservación seminal.

Un último aspecto que orientaba nuestro trabajo de investigación, fue la constatación que, a la hora de realizar técnicas de inseminación artificial, la mayoría de los veterinarios clínicos realizan pruebas muy básicas en el momento de valorar la calidad seminal de un individuo, mientras que en el caso de la hembra, además de orientarse observando los signos externos de celo, lo más habitual es realizar técnicas rápidas de detección de progesterona o citologías vaginales seriadas. Es por estas razones, por lo que además de realizar un trabajo de investigación sin perder la rigurosidad científica que requiere el desarrollo de una tesis doctoral, hemos querido desarrollar un estudio que tenga aplicaciones prácticas reales en la actividad clínica habitual.

Los objetivos de la presente tesis doctoral son:

1. Confirmar la viabilidad del semen canino congelado y conservado mediante el uso de ultracongeladores de -152 °C.
2. Comparar la calidad del semen crioconservado mediante nitrógeno líquido frente al semen crioconservado mediante el uso de ultracongeladores de – 152 °C.
3. Estudiar el efecto sobre la viabilidad seminal post-descongelación de dos concentraciones de glicerol (5 y 6%) en ambos métodos de crioconservación.
4. Determinar la influencia del tiempo de criopreservación sobre la calidad del semen.
5. Comprobar si existe variabilidad individual en la congelabilidad del semen.
6. Determinar la eficacia de diferentes procedimientos técnicos para definir el momento óptimo de inseminación artificial, tras un tratamiento de inducción del celo.
7. Comparar la fertilidad del semen congelado y conservado en nitrógeno líquido frente al congelado y conservado con el ultracongelador de -152 °C.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. ANATOMÍA DEL APARATO REPRODUCTOR MASCULINO EN LA ESPECIE CANINA

#### 2.1.1. Testículos

Los testículos representan el órgano reproductivo principal del macho. Su función es doble, porque además de producir los gametos masculinos (espermatozoides), generan una serie de hormonas esteroideas. La principal diferencia con los órganos genitales femeninos es que todos los gametos potenciales no están presentes desde el nacimiento, sino que las células germinales masculinas sufren continuas divisiones durante toda la vida reproductiva del animal (Hewitt, 2000).

En todas las especies animales, con independencia del sexo final del embrión, en el feto las gónadas primitivas migran hasta situarse cerca de los riñones. En este estadio es imposible diferenciar un testículo de un ovario, y sólo cuando puede establecerse esta diferenciación es cuando empieza a desarrollarse el epidídimo y el conducto deferente (Hewitt, 2000; Vázquez y cols., 2000).

En las diferentes especies domésticas está perfectamente establecido que los testículos descienden hasta el escroto a una determinada edad; sin embargo, en la especie canina no hay unanimidad a la hora de determinar cuáles son las condiciones necesarias para que los testículos se sitúen en el escroto. La teoría más ampliamente aceptada es que los testículos atraviesan el canal inguinal alrededor del cuarto día de vida (Allen, 1992) y se localizan en el interior del escroto entre los 10-14 días tras el nacimiento (Burke, 1986). No obstante, en otros estudios se defiende que el descenso testicular puede completarse durante el estadio fetal y prolongarse hasta los 6-8 meses de edad sin que ello represente una patología (Hewitt, 2000). El testículo debe migrar por el canal inguinal hasta el escroto; este fenómeno se produce cuando se desarrolla en el polo caudal del testículo un cordón mesenquimatoso, de apariencia gelatinosa, que se extiende desde la pared inguinal del feto hasta el testículo del lado correspondiente y que recibe el nombre de *gubernáculum* (Ruberte y Sautet, 1998; Sandoval, 2000). Cuando se termina el desplazamiento del testículo, el *gubernáculum* sufre una degeneración. La finalidad de esta migración es depositar al testículo en el interior del escroto envuelto por una bolsa de peritoneo que es la túnica vaginal (Hewitt, 2000), para finalmente adquirir una posición intraescrotal normal (Allen, 1992). Cuando el descenso testicular no se completa, quedando uno o ambos testículos

retenidos a nivel inguinal o abdominal, se desarrolla una alteración patológica denominada criptorquidia, situación relativamente frecuente en la especie canina (Batista y cols., 2000).

La morfología del testículo es ovoide y el eje mayor se encuentra en posición longitudinal (Allen, 1992). Aunque la especie canina presenta una gran variedad de formas y tamaños, se acepta que el tamaño medio de los testículos de un perro de raza mediana es 3 x 2 x 1.5 cm, existiendo una relación entre la masa corporal y el tamaño testicular (Hewitt, 2000; Johnston y cols., 2001). El testículo se encuentra constituido básicamente por una masa parenquimatosa perfectamente mantenida por un armazón o estroma de tejido conectivo fibroso, cuya fracción más densa y compacta es la túnica albugínea. Esta estructura parenquimatosa también representa el soporte necesario para los plexos nerviosos y el sistema vascular responsable de la nutrición del órgano (Ruberte y Sautet, 1998; Vázquez y cols., 2000).

Desde la túnica albugínea se proyectan una serie de septos hacia el interior del testículo, cuya función es la de separar a los lobulillos parenquimatosos. Estos lobulillos confluyen hacia el centro del testículo, a nivel del mediastino, y su función es sustentar la *rete testis* (Sandoval, 2000). La *rete testis* está formada por una serie de conductos anastomosados a nivel del mediastino, que se interponen entre los túbulos seminíferos y los conductillos eferentes que, a nivel de la cabeza del epidídimo, confluyen en el conducto epididimario (Christiansen, 1984; Frandson y Spurgeon, 1995). El parénquima se reagrupa en los espacios interseptales como lobulillos testiculares y cada uno de ellos está constituido por un pequeño número de túbulos seminíferos y de tejido intersticial (Sandoval, 2000). La espermatogénesis tiene lugar en los túbulos seminíferos que vierten los espermatozoides a la *rete testis* para conducirlos hasta el epidídimo que se encuentra en el exterior del testículo (Allen, 1992). Los túbulos seminíferos comienzan en la periferia del lobulillo intersticial como túbulos contorneados, largos y muy tortuosos y se transforman en túbulos seminíferos rectos antes de terminar en la *rete testis*. Adyacentes a la membrana basal de los túbulos seminíferos existe una densa capa de células espermatogénicas mantenidas por otras células no germinales que son las células de Sertoli (Sandoval, 2000). El tejido intersticial, donde se sitúan las células de Leydig que se encargan de sintetizar la testosterona, constituye la fracción extratubular del parénquima testicular y se agrupa en lóbulos adyacentes (Hewitt, 2000; Sandoval, 2000; Vázquez y cols., 2000).

### 2.1.2. Epidídimo

Es un conducto de gran longitud que se encuentra fuertemente enrollado sobre sí mismo. Se estructura de tal forma que pueden distinguirse tres porciones (Allen, 1992) perfectamente diferenciadas entre sí:

- Cabeza: situada en el borde cráneo-lateral del testículo y difícilmente puede palpase.
- Cuerpo: se sitúa sobre la superficie dorso-lateral y tampoco es posible su palpación.
- Cola: se localiza sobre el polo dorso-caudal, se palpa fácilmente en un perro sano normal y es una pequeña protuberancia.

La estructura anatómica más relevante desde el punto de vista reproductivo es la cola del epidídimo, ya que actúa como reservorio de espermatozoides hasta que se produce la eyaculación y desemboca en una estructura tubular recta que es el conducto deferente que también cumple funciones de almacenamiento de espermatozoides (Ruberte y Sautet, 1998; Hewitt, 2000).

Los espermatozoides maduran a lo largo de su paso por el epidídimo; en la especie canina, este período es de aproximadamente 14 días (Allen, 1992). Diversos autores describen la presencia de unas células llamadas espermiófagos en el testículo y en el propio epidídimo, cuya función sería la de fagocitar a los espermatozoides no eyaculados facilitando así su destrucción y posterior reabsorción (Illera, 1984).

### 2.1.3. Cordón espermático

Es una estructura que discurre entre el testículo y la pared abdominal. Está constituido por cuatro componentes (Allen, 1992; Hewitt, 2000):

- Conducto deferente: esta estructura discurre por el interior del saco vaginal y se encarga del transporte espermático desde el epidídimo hasta la uretra. Se dirige dorsalmente y penetra en la cavidad abdominal junto con el cordón espermático; a partir de aquí se sitúa cranealmente al uréter y desemboca en la uretra a nivel de la próstata craneal.
- Músculo cremaster: procede del músculo oblicuo abdominal interno situado cerca del anillo inguinal externo y se une a la túnica vaginal en el testículo. Se encarga de modificar la distancia desde los testículos al abdomen para producir una correcta termorregulación.



- Arteria espermática o testicular: discurre a través del plexo pampiniforme y se encarga de transportar sangre desde la aorta hasta el testículo.
- Vena espermática o testicular: esta vena se divide en un complejo de pequeñas venas (plexo pampiniforme) en el interior del cordón espermático, rodeando en este nivel a la arteria espermática. Su función es la de garantizar el retorno sanguíneo desde el testículo a la vena cava y secundariamente, como la sangre que regresa es fría, se garantiza una reducción de la temperatura de la sangre arterial que evita un calentamiento excesivo del testículo.

#### 2.1.4. Glándulas accesorias

##### 2.1.4.1. Próstata

Es una glándula simétrica, bilobulada mediante un septo intermedio. Representa la única glándula que anatómicamente es significativa en el perro y se localiza en el borde craneal de la pelvis. La uretra atraviesa completamente la pelvis para llegar a la base del pene, sin embargo, los conductos deferentes únicamente atraviesan una pequeña porción de la glándula antes de penetrar dorsalmente en la uretra. El tamaño prostático es tremendamente variable en función del peso, raza y edad del animal (Allen, 1992; Hewitt, 2000). En los perros, la próstata es la encargada de producir tanto la primera como la tercera fracción del eyaculado; para un perro de raza mediana, el volumen medio de secreción es de 1-2 mL para la primera fracción y de 2-4 mL la tercera (Burke, 1986). No obstante, en función de las razas caninas, se describen volúmenes de 0.1-2 mL para la primera fracción y de 1-30 mL para la tercera (Iguer-ouada, 2001). El tiempo que tarda en expulsarse la primera fracción oscila entre 30 segundos y 1 minuto (Allen, 1992; Peña, 1997), mientras que la tercera tiene un tiempo de eliminación que varía en torno a los 3-30 minutos, debido a su mayor aportación al eyaculado (Arthur, 1991; Allen, 1992; Peña, 1997). La función de la primera fracción es la de limpiar la uretra de los posibles restos de orina, mientras que la tercera es la encargada de aportar volumen al eyaculado asegurando de esta forma el ascenso de los espermatozoides por la vagina; asimismo, ambas fracciones cumplen una función bactericida (Allen, 1992).

##### 2.1.4.2. Ampolla

Aunque no tiene significado anatómico en el perro, cabe destacar que actúa como reservorio de espermatozoides en el conducto deferente antes de desembocar en la uretra (Hewitt, 2000).

### 2.1.5. Uretra, Pene y Prepucio

#### 2.1.5.1. Uretra

Es un conducto cuya misión es la de transportar tanto la orina como el semen. Se inicia en el cuello de la vejiga urinaria y se dirige caudalmente por el suelo de la pelvis atravesando la próstata; en este nivel, desembocan los conductos deferentes sobre su superficie dorsal. Caudalmente al isquion, la uretra penetra en el pene y discurre sobre su cara caudoventral, introduciéndose por el surco ventral del hueso peneano (Allen, 1992; Ruberte y Sautet, 1998).

#### 2.1.5.2. Pene

El pene posee un sustrato vascular de tejido eréctil (cavernoso y esponjoso) que garantiza la erección necesaria para la cópula. Además, también es el responsable de la forma y del grado de desarrollo del órgano genital; concretamente, en el perro presenta una gran cantidad de tejido eréctil (Allen, 1992; Hewitt, 2000; Sandoval, 2000).

En el pene se distinguen tres porciones bien definidas:

- Raíz del pene: es el extremo proximal del pene. Presenta dos pilares que se insertan en la superficie caudal del arco isquiático a cada lado de la sínfisis. Cada uno de los pilares se continúa con un cuerpo cavernoso que rápidamente confluyen entre sí para formar el cuerpo del pene. La uretra se localiza centralmente al cuerpo, rodeada por el cuerpo esponjoso del pene que es una continuación del bulbo uretral que se sitúa entre los pilares (Frandsen y Spurgeon, 1995; Sandoval, 2000).
- Cuerpo del pene: se sitúa entre la convergencia de los pilares y el glande. Su base anatómica son los cuerpos cavernosos. En el perro es corto, cilíndrico y poco aparente debido al escaso desarrollo de los cuerpos cavernosos (Sandoval, 2000).
- Glande del pene o *glans penis* (Allen, 1992; Sandoval, 2000) comienza en la unión con la mucosa prepucial y consta de:
  - Bulbo peneano: es difícil de observar si no hay erección. Está constituido por tejido esponjoso, siendo una característica de la especie canina que la mayor cantidad de cuerpo esponjoso se encuentre formando parte del bulbo. En el momento de la erección, el bulbo adopta una forma más o menos esférica que se localiza en el cuarto proximal

del pene cerca de la región testicular, siendo el responsable del acoplamiento del pene en el interior de la vagina en el momento del coito.

- Porción larga del pene: es cilíndrica en todo su trayecto y constituye las tres cuartas partes distales del glande. Termina de forma acuminada en la abertura de la uretra, pero previamente presenta un rudimento de corona.
- Hueso peneano: es una osificación del extremo distal del cuerpo cavernoso. Se sitúa en el interior del glande, es ancho proximalmente y más estrecho distalmente, presentando un surco ventral donde se aloja la uretra. Junto al tejido esponjoso que lo rodea, es el que determina el tamaño del glande del pene en el perro.

La erección en el perro, ocurre fundamentalmente por un aumento en la turgencia debido a que existe más entrada que salida de sangre, generando un aumento de la presión dentro del sistema circulatorio peneano. Para que este fenómeno ocurra se genera una vasodilatación arterial por estímulo de los nervios erectores del plexo pélvico y una reducción del drenaje venoso, motivado en parte por la compresión de las venas dorsales del pene entre el arco isquiático y el pene al contraerse los músculos isquiocavernosos (Ruberte y Sautet, 1998). En el momento de la erección, el pene aumenta de diámetro y de longitud debido a la gran cantidad de tejido eréctil que posee. El bulbo del pene finaliza su erección completa después que la del glande debido a que es necesario la presión que ejercen los músculos de la vulva y la vagina sobre el bulbo del pene, evitando así que los animales puedan separarse durante el coito hasta que el pene vuelva a ponerse flácido tras la eyaculación (Christiansen, 1984; Frandson y Spurgeon, 1995).

#### 2.1.5.3. Prepucio

El prepucio cubre completamente al pene cuando no se encuentra erecto. Su cara externa se encuentra revestida por la piel e internamente está formado por una mucosa que se continúa con la mucosa del glande peneano o *glans penis* (Allen, 1992).

## 2.2. GAMETOGENESIS EN EL PERRO

### 2.2.1. Espermatogénesis

La gametogénesis comienza ya en el estadio fetal donde las células primordiales se diferencian en gonocitos que sufrirán procesos de mitosis tanto durante la vida fetal como en la prepuberal; a este nivel, es cuando se diferenciarán en espermatogonias, momento en el cual se detiene el desarrollo de las células germinales a nivel de los túbulos seminíferos, hasta que comience la pubertad (Allen, 1992; Hewitt, 2000).

El proceso de formación de los espermatozoides en los túbulos seminíferos comienza aproximadamente a los 4 meses de edad y dura unas 8 semanas (McDonald y Pineda, 1989), si bien, la aparición de los primeros espermatozoides en el eyaculado no se define hasta los 10-12 meses de edad. No obstante, hay autores que definen que las células de Leydig no completan su maduración hasta los 5 meses, pudiendo encontrar espermatozoides en los túbulos seminíferos sobre los 6-7 meses de edad (Hewitt, 2000). La espermatogénesis se ve alterada cuando la temperatura testicular es muy alta, por lo que se dispone de una serie de estructuras (saco escrotal, músculo cremaster, músculo dartos, vasos sanguíneos en el cordón espermático) que garantizan la temperatura idónea para que este proceso pueda tener lugar, ya que a la temperatura fisiológica del animal es imposible (Allen, 1992; Hewitt, 2000).

### 2.2.2. Espermatocitogénesis

Representa la primera fase de la espermatogénesis y consiste en la producción cíclica de espermaticitos primarios. Aparte de las células en división, hay presente una reserva de espermatogonias en estado de latencia que son extremadamente resistentes a las agresiones por radiaciones y toxinas, pudiendo incluso sobrevivir a traumatismos graves en los testículos (Allen, 1992; Hewitt, 2000). Está descrito que en la especie canina, cada espermatogonia es capaz de producir un total de 64-96 espermatozoides (McDonald y Pineda, 1989).

Estas espermatogonias, que son las células precursoras de los espermatozoides, se localizan en la membrana basal de los túbulos seminíferos y sufren procesos de mitosis para generar los espermaticitos primarios que, posteriormente, sufrirán procesos de meiosis para dar lugar a los espermaticitos secundarios. Finalmente, los espermaticitos secundarios se convertirán en espermátidas esféricas que ya contienen la mitad de cromosomas (Allen, 1992; Hewitt, 2000).

### 2.2.3. Espermiogénesis

En esta fase, las espermátidas esféricas se transforman en espermátidas maduras que serán liberadas al lumen de los túbulos seminíferos como espermatozoides (Allen, 1992).

Para que ocurra la transformación es necesario que ocurra un complejo reagrupamiento de los orgánulos de la espermátidas maduras que darán lugar a los espermatozoides. Básicamente, el núcleo pasa a ser la cabeza, el aparato de Golgi generaría el acrosoma y por último, las mitocondrias y los centriolos darán lugar al desarrollo de la cola. Las células de Sertoli, que se sitúan sobre la membrana basal de los túbulos seminíferos, retienen la mayor parte del citoplasma; de esta forma, participan en la regulación del paso de espermátidas maduras a espermatozoides (Allen, 1992; Hewitt, 2000).

### 2.2.4. Espermiación

Esta fase simplemente consiste en la liberación de los espermatozoides desde el compartimento basal de los túbulos seminíferos hasta el lumen (Allen, 1992; Hewitt, 2000).

### 2.2.5. Morfología del espermatozoide

El espermatozoide es una célula altamente especializada que ha evolucionado para desarrollar una única función: fecundar al óvulo. Presenta a nivel de la cabeza una serie de mecanismos encargados de garantizar la penetración del ovocito y transmitirle así el material genético; por otro lado, la cola posee una maquinaria metabólica encargada de dotar de movimiento al espermatozoide (Illera, 1984). Estructuralmente se diferencian en el espermatozoide:

- a) *Cabeza*: en su interior se sitúa el núcleo y recubriendo su polo craneal se encuentra el acrosoma con las enzimas acrosómicas (Hewitt, 2000). La extensión del núcleo es de un tercio de la longitud total de la cabeza (Frandsen y Spurgeon, 1995). El acrosoma es un saco membranoso invertido que contiene un complejo lipoglicoprotéico específico que incluye una serie de enzimas, tales como la hialuronidasa y acrosina. La primera de ellas se encarga de degradar los mucopolisacáridos y es posible que provoque la dispersión del cúmulus oóforos del ovocito. En cambio, la segunda facilita la penetración del espermatozoide a través de la zona pelúcida del ovocito (Illera, 1984).
- b) *Segmento o pieza intermedia*: formado por las mitocondrias que se alinean extremo con extremo en bandas que se enrollan en espiral para formar una hélice y cuya función es

la de garantizar el metabolismo del espermatozoide y asegurar su movilidad (Frandsen y Spurgeon, 1995; Hewitt, 2000).

- c) *Cola*: gracias a su movimiento flagelar permite el movimiento del espermatozoide (Hewitt, 2000). De dos centriolos situados en la porción terminal de la pieza intermedia parten una serie de fibrillas hacia la cola, presentando dos fibrillas centrales rodeadas de un anillo de nueve pares periféricos de fibrillas contráctiles, responsables del movimiento del espermatozoide (Frandsen y Spurgeon, 1995).

Los espermatozoides del perro y el gato presentan una cabeza aplanada y en forma de espada, siendo esta morfología similar a los de humano, toro y conejo (Hewitt, 2000). Los espermatozoides maduros presentan un citoplasma escaso que es un resto del citoplasma de las espermatidas. Esta pequeña cantidad de citoplasma representa la gota citoplasmática presente en los espermatozoides cuando abandonan el epitelio germinal para posteriormente perderse por su paso por el epidídimo (Illera, 1984).

Se han realizado una serie de estudios para establecer las medidas de los espermatozoides caninos. Así, se obtuvieron como valores medios ( $\pm$  sem) los siguientes: longitud total,  $68 \pm 0.3$   $\mu\text{m}$ ; longitud de la cabeza,  $7 \pm 0$   $\mu\text{m}$ ; ancho de la cabeza,  $5 \pm 0.1$   $\mu\text{m}$ ; longitud de la pieza intermedia,  $11 \pm 0.2$   $\mu\text{m}$ ; y la longitud de la cola,  $50 \pm 0.3$   $\mu\text{m}$  (Hewitt, 2000).

#### 2.2.6. Transporte del semen

A su llegada a la cabeza del epidídimo los espermatozoides son inmaduros y símbolo de ello es la gota citoplasmática residual que presentan en el cuello. La maduración ocurre durante el avance a través del cuerpo y la cola del epidídimo. No está claro cómo se produce este avance, parece ser que está propiciado posiblemente por la constante producción de espermatozoides por parte del testículo (Allen, 1992), aunque otros autores sostienen que es resultado del peristaltismo existente a lo largo del epidídimo (Hewitt, 2000). La maduración es un proceso que dura unas 2 semanas, incluidas dentro de las 8 semanas que dura la espermatogénesis. En el momento en que el espermatozoide penetra en el conducto deferente, la gota citoplasmática se desplaza hacia el extremo distal de la pieza intermedia o bien es expulsada considerándose en este momento al espermatozoide como maduro.

## 2.3. PRODUCCIÓN SEMINAL EN EL PERRO

### 2.3.1. Métodos y frecuencia de recogida

#### 2.3.1.1. Métodos

##### *1. Recogida manual o digital*

Es el método más utilizado en la especie canina y consiste en la estimulación manual del bulbo del pene. En la mayoría de los trabajos se recomienda la presencia de una hembra en celo, perfectamente inmovilizada para permitir que el macho olfatee la región vulvar y conseguir una estimulación que facilite la recogida. Cuando no se dispone de esta hembra, muchos autores recomiendan el uso de gasas o algodón impregnados en secreciones vaginales de una hembra en celo, ya que pueden congelarse y descongelarse 15 minutos antes de su uso. En el caso de que tampoco tengamos esta última posibilidad, se puede recurrir a disponer de una hembra sumisa e incluso de un macho castrado y, si fuese posible, se les impregna la cola con secreciones de hembra en celo. Finalmente, si no resulta posible disponer de monturas vivas, se puede llevar a cabo una estimulación manual del bulbo del pene aunque el macho no esté previamente excitado, consiguiendo en machos entrenados que el bulbo se estimule con bastante facilidad aunque no contemos con la presencia de una hembra en celo (Burke, 1986; Allen, 1992; Concannon, 1993; Silva y Verstegen, 1995; Silva y cols., 1996; Hay y cols., 1997a; Peña y Linde-Forsberg, 2000a, b; Yildiz y cols., 2000; Iguer-ouada y Verstegen, 2001; Rigau y cols., 2001; Rijsselaere y cols., 2002; Rijsselaere y cols., 2003; Albarracín y cols., 2004; Kutzler, 2005a).

En cualquier caso, el procedimiento consiste en estimular el bulbo del pene y una vez que se haya conseguido aumentar su tamaño en un 40-50% (Burke, 1986), se exterioriza el bulbo fuera del prepucio para garantizar una rotación del pene de 180°. Una vez alcanzado un tamaño suficiente, se realizan sobre el bulbo ligeras contracciones, simulando las que se producen de forma fisiológica en la vagina de la hembra (Farstad, 2000a; Kutzler, 2005a). La erección del pene se produce porque los impulsos nerviosos generan una dilatación de las arterias pudendas interna y externa del cuerpo cavernoso del pene. La contracción de los músculos isquiouretrales impide el retorno venoso a través de los cuerpos cavernosos. Por lo tanto, la erección ocurre debido a la retención sanguínea que genera el aumento de volumen del bulbo del pene, el alargamiento del glande y el incremento de tamaño de la porción larga del glande alrededor del hueso peneano (Kutzler, 2005a).

La eyaculación acontece por la estimulación de los nervios simpáticos y, una vez que comienza, se rota el pene en sentido caudal; con esta rotación se consigue, además de simular lo que sucede en una monta natural, una oclusión de la vena emisaria del glande que impide que se genere una disminución de la erección. Se recomienda no realizar la rotación antes de este momento porque se podría generar una detumescencia del pene y por consiguiente una pérdida de la erección (Kutzler, 2005a). Las tres fracciones del eyaculado se recogen por separado en tubos calibrados de plástico o de cristal a 37 °C (Burke, 1986; Allen, 1992; Silva y Verstegen, 1995; Peña y Linde-Forsberg, 2000a, b; Kutzler, 2005a).

## *II. Vagina artificial*

Está formada básicamente por un cilindro rígido de unos 15 cm de longitud que se encuentra rodeado por una camisa de caucho donde se deposita agua a 40 °C a través de una válvula; en algunos casos también es posible insuflar aire para aumentar la presión. En un extremo del cilindro se coloca un embudo de caucho que está unido a un tubo colector graduado a 37 °C, que se va cambiando conforme se van recogiendo las diferentes fracciones del eyaculado (Peña, 1997). Aunque es una técnica válida de recogida, en la especie canina hay estudios que han demostrado que la cantidad y la calidad del semen recogido mediante estimulación manual es mucho mejor (Arthur, 1991), además de que es una técnica más complicada de aplicar y que el contacto prolongado del semen con el látex puede resultar tóxico para los espermatozoides (Arthur, 1991) e incluso provocar su completa inmovilidad (Allen, 1992; Kutzler, 2005a). Como el látex resulta tóxico, hay autores que recomiendan utilizar guantes de vinilo o incluso polvos de talco que afectan escasamente a la motilidad (Kutzler, 2005a).

La técnica consiste en introducir el pene dentro de la vagina artificial cuando haya alcanzado más de un 50% de erección. El pene se coloca en el interior de la vagina una vez que está erecto y que se haya exteriorizado el bulbo, colocando los dedos detrás del bulbo y empujando suavemente el pene dentro de la vagina artificial hasta conseguir la eyaculación (Burke, 1986; Allen, 1992). Es posible retirar el pene sin que se haya eliminado completamente la tercera fracción, pero debe hacerse con cuidado para evitar provocar laceraciones e infecciones. Otra complicación que puede ocurrir es el hecho de que se produzcan quemaduras en el pene debido a agua excesivamente caliente en la vagina. Todos estos inconvenientes pueden provocar un detrimento de la libido para recogidas sucesivas (Burke, 1986).



### *III. Cono de látex*

Es una variante de la técnica anterior, pero en la que solamente se utiliza un embudo o cono de látex al que se encuentra unido un tubo colector graduado a 37 °C cubierto de una envoltura protectora. El cono se sitúa justo encima del bulbo del pene para conseguir una compresión enérgica y provocar así la eyaculación. Este método dificulta la separación de las tres fracciones del eyaculado y, además, el látex puede ser tóxico para los espermatozoides (Allen, 1992; Peña, 1997; Threlfall, 2005). En algunos trabajos se recomienda su uso para animales principiantes o inexpertos, donde las fracciones son difícilmente identificadas, porque es más relajante para el animal (Kutzler, 2005a).

### *IV. Electroeyaculador*

El equipo está constituido por un electrodo bipolar y una fuente variable de corriente alterna. Su funcionamiento consiste en colocar el electrodo en el recto justo encima de las glándulas accesorias y conseguir estimular de esta forma a los nervios que controlan el sistema reproductivo (Howard y cols., 1986; Bearden y Fuquay, 1997; England, 1999). Generalmente las sesiones constan de tres series de 30-40 estímulos/serie. Los estímulos se aplican siguiendo un patrón de 3 segundos de estímulo seguido de 3 segundos de parada, aumentando el voltaje desde 0-10 voltios, situándose el rango normal entre 2-5 voltios (Howard y cols., 1986).

Este método se cita como una técnica eficaz para la obtención de semen en cánidos salvajes como el lobo o el zorro, pero no se considera un método óptimo de recogida habitual en perro porque se desconoce hasta que punto afecta a la libido del animal (Howard y cols., 1986). Sin embargo, en algunos trabajos se ha comprobado que la concentración y la motilidad espermática no difiere entre semen obtenido por estimulación manual y mediante electroeyaculación (Kutzler, 2005a).

### *V. Recogida seminal utilizando fármacos*

Si bien se ha comprobado que el uso combinado de xilacina e imipramina es capaz de generar una recogida seminal, presenta el inconveniente de ser una eyaculación de tipo pasivo por lo que gran cantidad de espermatozoides pasan a la vejiga urinaria y cuando se eyaculan están muertos, probablemente porque las muestras se contaminan con la orina (Kutzler, 2005a).

### *VI. Obtención del semen del epidídimo*

Se ha descrito que tras una orquidectomía rutinaria, se puede obtener semen a partir del epidídimo. Los testículos se introducen en solución de tampón de fosfato sódico (PBS) a temperatura ambiente; posteriormente se procede a la disección y apertura de la cola del epidídimo y de los conductos deferentes, y finalmente se añade suero salino y soluciones tamponadas a la suspensión espermática para conseguir un volumen y unos nutrientes necesarios para que los espermatozoides puedan moverse (Hewitt y cols., 2001). Asimismo, los espermatozoides presentes en el epidídimo pueden obtenerse realizando un lavado y una separación en dos pasos mediante un gradiente de Percoll discontinuo (Hishinuma y Sekine, 2004).

#### 2.3.1.2. Frecuencia de recogida

No hay unanimidad a la hora de establecer unos patrones de recogida seminal en el perro. Hay autores que realizan recogidas de 3-4 eyaculados totales/ perro a la semana con una distribución de 2-3 recogidas semanales (Hay y cols., 1997a; Yildiz y cols., 2000; Rigau y cols., 2001). Sin embargo, en otros trabajos se defiende que es posible mantener una frecuencia de recogida de 2 eyaculados/perro cada 2 días, sin que se observe un marcado descenso de la calidad seminal (England, 1999).

La mayoría de los autores recomiendan utilizar sólo el primer eyaculado, tanto para inseminar como para la refrigeración y/o la congelación seminal. Sin embargo, hay estudios en los que se trabaja con los dos eyaculados, con un intervalo de tiempo de 45-75 minutos entre el primer y el segundo eyaculado (England, 1993; Peña y Linde-Forsberg, 2000a, b), sin observar un descenso evidente de la calidad seminal.

### 2.3.2. Características del semen en la especie canina

En el perro, el eyaculado se divide en tres fracciones bien diferenciadas entre sí, cuya eliminación ocurre progresivamente durante la eyaculación, si bien en animales muy entrenados es posible observar un periodo de latencia entre cada una de las fracciones. Las características de estas tres fracciones son las siguientes:

- a) *Primera fracción, preespermática o uretral*: se elimina de forma muy rápida, oscilando el tiempo entre 30 segundos y 1 minuto. Presenta un aspecto acuoso y transparente, debido a la ausencia de espermatozoides o a su escaso número. En otras especies, es sabido que esta fracción procede de las *glándulas de Littré* que se localizan en la mucosa uretral; sin embargo, la especie canina no presenta estas glándulas por lo que, se deduce que, al igual que la tercera fracción, esta primera procede de la actividad secretora de la próstata. Su función principal se considera que es la eliminación de orina residual y la posible contaminación presente en la uretra (Allen, 1992; Peña, 1997).
- b) *Segunda fracción o espermática*: su tiempo de emisión oscila entre 1-2 minutos, siendo la fracción rica en espermatozoides. Su aspecto es más o menos denso y su color oscila de blanco lechoso a blanco opalescente en función de la concentración. La procedencia es del epidídimo (Peña, 1997) y de los conductos deferentes (Allen, 1992).
- c) *Tercera fracción o prostática*: su eliminación se prolonga en el tiempo entre 3-30 minutos. El aspecto que presenta es acuoso, transparente o ligeramente amarillento y no contiene espermatozoides o están presentes en un bajo número. Como su nombre indica, procede de la próstata y se considera que facilita la ascensión de los espermatozoides en su camino al útero (Arthur, 1991; Allen, 1992; Peña, 1997; Threlfall, 2005).

En general, los valores totales de un eyaculado normal en perro (valores medios) serían de un volumen entre 4-25 mL, una osmolaridad de 320mOsm y un pH de 6.5-6.6 (Peña, 1997).

### 2.3.2.1. Características macroscópicas

#### I. *Color*

Un semen de buena calidad presenta un color blanco lechoso. Si se observara un color amarillento denotaría la presencia de orina, mientras que si es rojo o marrón sería indicativo de presencia de sangre fresca o hemolizada (Burke, 1986; Seager, 1986).

Este parámetro se evalúa mediante la observación directa del semen en el tubo graduado (vidrio o plástico) utilizado para la recogida (Peña, 1997; Kutzler, 2005a; Threlfall, 2005).

#### II. *Volumen*

Al igual que el parámetro anterior, el volumen del eyaculado se valora mediante observación directa en el tubo colector graduado (Burke, 1986; Seager, 1986; Allen, 1992; Concannon, 1993; Farstad, 2000b; Iguer-ouada, 2001).

Los valores medios para un perro de raza mediana serían de 1-2 mL para la primera fracción, la segunda presentaría de 1-2 mL y finalmente unos 4-8 mL para la tercera (Burke, 1986). Sin embargo, lo más frecuente es que en función de la raza y el perro, se obtengan volúmenes de 0.1-2 mL de primera fracción, 0.2-4 mL para la segunda y 1-30 mL de tercera fracción (Concannon, 1993; Iguer-ouada, 2001; Threlfall, 2005).

### 2.3.2.2. Características microscópicas

#### I. *Concentración*

Habitualmente el modo de valoración de la concentración espermática se basa en realizar una dilución de la muestra de semen con solución salina formolada (Silva y Verstegen, 1995). Para la determinación de la concentración, se toma una muestra de esta dilución y se coloca en un hemocitómetro o cámara de Thoma-Neubauer, para finalmente observarse en un microscopio óptico a 40x (Rijsselaere y cols., 2002; Threlfall, 2005). El número total de espermatozoides se calcula en función de la concentración y el volumen (Allen, 1992; Farstad, 2000a).

Otro procedimiento para determinar la concentración espermática, es valorar la opacidad mostrada por una muestra de semen diluido en solución salina formolada o solución isotónica de citrato, mediante un espectrofotómetro previamente calibrado; otros procedimientos técnicos (Spermacue®, Minitüb, Alemania) no requieren diluir el semen, sino que directamente se puede determinar la concentración espermática, a partir de una gota de semen, lo único que se requiere

es calibrar el aparato en función de la especie animal a la que se pretenda medir este parámetro (Rota y cols., 1999a, b; Peña y Linde-Fosberg, 2000a, b; Peña y cols., 2003).

En el perro hay descritos valores de concentración que oscilan entre 300-2000 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL (esp/mL), considerándose normal para un perro de tamaño mediano 300 x 10<sup>6</sup> esp/mL (Burke, 1986; Concannon, 1993). Sin embargo, otros autores describen concentraciones que varían entre 200 a más de 2000 x 10<sup>6</sup> esp/mL. Se considera que la concentración mínima aceptable que debe presentar un semen para utilizarse en una inseminación en fresco sería de 100 x 10<sup>6</sup> esp/mL (Farstad, 2000a; Iguer-ouada, 2001; Threlfall, 2005).

La observación de una baja concentración espermática puede deberse a una eyaculación incompleta generada frecuentemente por nerviosismo en machos jóvenes e inexpertos (Allen, 1992). También se puede observar este descenso en la concentración espermática en aquellos individuos tratados con esteroides anabolizantes u otros andrógenos; esta situación suele tener carácter transitorio, volviendo el eyaculado a la normalidad 2 meses tras la supresión del tratamiento (Allen, 1992). Asimismo, se debe tener en cuenta que valores bajos de concentración se deben en muchas ocasiones a que se recoge un excesivo volumen de fluido prostático que enmascara el verdadero número de espermatozoides presentes en la muestra seminal (Peña, 2004). Además, también es posible observar una disminución de la concentración cuando la eyaculación es incompleta (Peña, 2004).

Es posible también que se presente una baja concentración espermática en aquellos individuos que hayan desarrollado una aplasia del epidídimo y/o de los conductos deferentes (Batista y cols., 1998) o que algunas estructuras testiculares se hayan fibrosado como consecuencia de traumatismos o infecciones (Allen, 1992; Keenan, 2000). Cualquier tipo de alteración a nivel escrotal (dermatitis, heridas, infecciones) también genera un descenso de la concentración del eyaculado así como la presencia de inflamaciones como orquitis o epididimitis (Burke, 1986; Keenan, 2000). Otras posibles causas son la presencia de anomalías testiculares: criptorquidia unilateral, tumores de células de Sertoli, seminomas, tumor de células intersticiales, degeneración testicular, etc... (Allen, 1992).

## II. *Motilidad*

El método tradicional para determinar la motilidad espermática consiste en utilizar una gota de semen que se deposita entre un porta y un cubre para evaluar el movimiento de los espermatozoides, generando así una película fina que permita determinar de forma más o menos precisa el número de células móviles presentes en la muestra, e incluso realizar una valoración de si el tipo de movimiento observado es normal o no. Se observan varios campos por muestra utilizando para ello un microscopio óptico con contraste de fases a 200-400 aumentos. Como todo el material debe encontrarse a temperatura de 37-39° C, se debe disponer de una placa térmica y el microscopio debe poseer una platina calentadora o una cámara con bulbos de luz incandescente (Peña, 1997; Peña, 2004; Threlfall, 2005; Alamo y cols., 2005). En muestras muy concentradas es recomendable realizar una dilución del semen en suero salino o un tampón de TRIS-fructosa (Rigau y cols., 2001). La motilidad puede verse alterada tanto por una inadecuada temperatura como por la presencia de sustancias tóxicas en el equipo de recolección.

Actualmente, cada vez más autores están utilizando el sistema CASA (Computerized Assisted Sperm Analysis) para obtener un valor preciso y objetivo de la motilidad espermática y de la calidad del movimiento de los espermatozoides presentes en la muestra (Peña y Lindforsberg, 2000a; Rigau y cols., 2001; Rijsselaere y cols., 2003, 2004, 2005a, b; Peña, 2004). Este sistema ha provisto de interesantes resultados sobre los porcentajes medios de motilidad y las diferentes subpoblaciones de espermatozoides que coexisten en una misma muestra. Esta técnica es posible utilizarla tanto en semen fresco como en el congelado, refrigerado o capacitado (Peña, 2004) y también determina la concentración espermática. No obstante, presenta una serie de inconvenientes debido a que es necesario diluir las muestras hasta obtener concentraciones de 50-100 x 10<sup>6</sup> esp/mL y no permite realizar una distinción entre espermatozoides y las partículas de yema de huevo de los diluyentes (Rijsselaere y cols., 2003). Asimismo, es necesario realizar estudios más concienzudos y establecer comparaciones entre laboratorios (Verstegen y cols., 2002; Rijsselaere y cols., 2003).

El valor normal de la motilidad del semen fresco en la especie canina oscila entre 85-95%. Se considera que un valor por debajo del 80% de motilidad en semen fresco sería indicativo de una reducción de la fertilidad (Threlfall, 2005). No obstante, la mayoría de los autores considera que un semen presenta una buena motilidad cuando presenta valores entre 70-90% (Burke, 1986; Allen, 1992; Concannon, 1993; Silva y Verstegen, 1995; Silva y cols., 1996; Hay y cols.,

1997a; Farstad, 2000a; Peña y Linde-Forsberg, 2000a, b; Yildiz y cols., 2000; Iguer-ouada, 2001; Iguer-ouada y Verstegen, 2001; Albarracín y cols., 2004).

Cuando el semen ha sido sometido a un procedimiento de refrigeración, se considera que la motilidad puede oscilar entre 20-80% (Iguer-ouada y Verstegen, 2001), aunque en otros trabajos se obtienen valores del 79-93% (Rota y cols., 1995). Como norma general, se acepta que la motilidad seminal post-refrigeración es aceptable cuando alcanza valores del 60-70% (Rota y cols., 1995; Peña y Linde-Forsberg, 2000a, b; Iguer-ouada y Verstegen, 2001).

En referencia a la motilidad seminal post-congelación se describen valores entre 10-80%, pero la calidad seminal se considera como buena cuando el valor de motilidad se sitúa por encima del 60% (Hay y Goodrowe, 1993; Wilson, 1993; Rota y cols., 1995; Silva y Verstegen, 1995; Silva y cols., 1996; Yildiz y cols., 2000; Alamo y cols., 2005); aún así en algunos trabajos se describe que, para considerarse de buena calidad, el valor mínimo de motilidad del semen descongelado debe ser del 50% (Farstad, 2000a). Finalmente, algunos autores hacen referencia a inseminaciones realizadas con semen congelado que presentaba una motilidad ligeramente por encima del 35% (Nöthling and Volkmann, 1993).

Para la realización de inseminación artificial no se encuentra completamente definido el número mínimo de espermatozoides móviles necesarios para obtener óptimos resultados de fertilidad. Sin embargo, en algunos estudios se ha comprobado que es necesario disponer, en fresco, de  $200 \times 10^6$  espermatozoides móviles para obtener valores de fertilidad comparables a los obtenidos mediante monta natural (Farstad, 2000a; Eilts y cols., 2005). Si se utiliza semen congelado y se realiza una inseminación intrauterina se recomiendan que entre  $150-200 \times 10^6$  espermatozoides sean móviles, aunque se han obtenido camadas con muestras de menor motilidad (Linde-Forsberg y cols., 1999; Tsutsui y cols., 2000); se ha definido que el único parámetro seminal que tenía relación con el rango de implantación era la motilidad progresiva que mostraban los espermatozoides (Nöthling y cols., 1997).

Recientemente se han realizado estudios que establecen una correlación entre la calidad *in vitro* que presenta una muestra seminal y la tasa de fertilidad que se obtiene *in vivo*. Asimismo, en estos estudios se establecen las similitudes o diferencias entre el porcentaje de fertilidad entre monta natural e inseminación artificial (Rijsselaere y cols., 2005a, b).

### III. *Vitalidad*

El procedimiento más habitualmente utilizado para la valoración de la vitalidad son las técnicas de tinción vital que permiten diferenciar los espermatozoides vivos de los muertos debido a la permeabilidad de la membrana plasmática a los colorantes vitales; por lo tanto, aquellas células que presentan una membrana plasmática funcional no permiten el paso del colorante, mientras que si está alterada el colorante penetra en el interior de la célula y aparece teñida (Farstad, 2000a; Peña, 2004).

El método más tradicional es la tinción con eosina-nigrosina, que también se utiliza para la valoración de las morfoanomalías; pero algunos autores describen el uso de otras tinciones como la eosina-azul anilina, trypan blue o el hypo-osmotic swelling test -HOST- (Rodríguez-Gil y cols., 1994; Peña, 2004). En el caso concreto del HOST, algunos autores han encontrado una correlación entre motilidad y vitalidad espermáticas, pero no existe correlación entre la motilidad, vitalidad y las morfoanomalías (Rodríguez-Gil y cols., 1994). No obstante, no se ha podido establecer fehacientemente una relación entre el HOST y la fertilidad en el perro (Peña, 2004).

El procedimiento muestra una extensión donde aparecen células vivas de color blanco sobre un fondo púrpura, o teñidas de rosa si están muertas (Iguer-ouada y Verstegen, 2001). El mayor inconveniente que presenta el uso de la eosina-nigrosina es que, al ser un colorante hipotónico que se añade a una muestra que no ha sido fijada químicamente, puede producir morfologías anormales en los espermatozoides, especialmente defectos en la cola (Peña, 2004). La extensión se valora en un microscopio provisto de contrastes de fases a 100-400 aumentos, y se deben contar un mínimo de 200 células y, a partir de ahí, extrapolar el porcentaje de células vivas (Alamo y cols., 2005; Batista y cols., 2006).

En la mayoría de los trabajos, se considera que un semen es de muy buena calidad cuando se observa un 90-95% de espermatozoides vivos en fresco (Silva y Verstegen, 1995; Silva y cols., 1996; Ivanova-Kicheva y cols., 1997; Albarracín y cols., 2004). En cuanto al semen congelado, el valor mínimo aceptable de vitalidad es del 80% (Silva y cols., 1996).

### IV. *Morfología*

Como se ha señalado en el apartado anterior, la tinción habitualmente utilizada para valorar la morfología de los espermatozoides es la de eosina-nigrosina. La realización de esta técnica puede afectar a la morfología, por lo que las extensiones no deben realizarse de forma brusca



para evitar roturas en las cabezas y colas, así como provocar la aparición de posturas anormales de los espermatozoides que enmascaran el resultado real, generando un número anormalmente alto de morfoanomalías. Además hay que asegurar que la muestra no ha sufrido ninguna modificación tras la recolección (Burke, 1986; Allen, 1992; Concannon, 1993; Thomas y cols., 1993; Silva y Verstegen, 1995; Silva y cols., 1996; Peña y Linde-Forsberg, 2000a, b; Yildiz y cols., 2000; Iguer-ouada, 2001; Iguer-ouada y Verstegen, 2001).

Otras causas que pueden provocar la aparición de morfoanomalías son el estrés asociado a inflamaciones localizadas a nivel genital, hipertermia, infecciones del tracto reproductivo, disminución de la secreción de LH y testosterona o alteraciones iatrogénicas (Paramo y cols., 1993; Kawakami y cols., 1998; England, 1999). Es frecuente el uso combinado de tinciones para valorar la vitalidad, con colorantes que permitan diferenciar el estado del acrosoma, como por ejemplo el uso combinado de Trypan blue y Giemsa o Trypan blue, Bismarck brown y Rosa de Bengala, consiguiendo así valorar tanto la vitalidad, como las morfoanomalías y las acrosomías (Peña, 2004). En el caso concreto de las acrosomías, es posible el uso del Spermac®, pero no es posible establecer diferencias entre células vivas y muertas (Farstad, 2000a; Peña, 2004).

Por otro lado, mediante el uso de tinciones fluorescentes es posible realizar la valoración de la integridad de membrana tanto en semen fresco como congelado (Peña, 2004; Rijsselaere y cols., 2005b). La utilidad de estas tinciones se centra principalmente en las muestras congeladas, ya que de esta forma no se observan tantos artefactos como con las técnicas tradicionales. Se utilizan por ejemplo, carboxyfluorescein diacetate (CFDA) y propidium iodide (PI) conjuntamente con citometría de flujo (Peña y cols., 1998; Peña, 2004). No se obtienen buenos resultados a la hora de evaluar las acrosomías, ya que muchas de estas tinciones se basan en la unión específica de antígeno-anticuerpo entre el colorante fluorescente y receptores presentes en la membrana del acrosoma (Peña, 2004).

Las morfoanomalías que se pueden encontrar se clasifican en primarias, que son aquellas que aparecen como consecuencia de una alteración de la espermatogénesis (malformaciones de la cabeza, de la pieza intermedia y del flagelo) y las secundarias, que son debidas a un fallo en la espermiogénesis o a una inadecuada manipulación del semen por parte del examinador (persistencia de la gota citoplasmática, flagelos doblados, ruptura del acrosoma). En el caso de la gota citoplasmática proximal se ha visto que en la especie canina afecta a la fertilidad; sin

embargo, la presencia de un flagelo abaxial no parece tener efecto sobre la fertilidad en el perro (Peña, 2004; Threlfall, 2005).

De manera general, nos encontramos con los siguientes tipos de morfoanomalías: acrosomías, anomalías en la cabeza, en el cuello, en la pieza intermedia y en la cola del espermatozoide. Independientemente de la tinción empleada, algunos autores sostienen que la determinación de las morfoanomalías se basa en criterios subjetivos; por tanto, se propone la utilización del sistema CASA para conseguir una medida más objetiva (Peña, 2004; Rijsselaere y cols., 2005b).

El porcentaje de morfoanomalías aceptable en una muestra de semen en fresco debería situarse como máximo en un 20-25% (Peña, 2004), encontrando normalmente un 10-20% de anomalías secundarias y 10-15% de primarias (Burke, 1986; Iguer-ouada, 2001). Puede ser indicativo de una reducción de la fertilidad si la muestra presenta valores por debajo del 80% de espermatozoides normales vivos, aunque algunos autores aceptan valores de 65-70% (Concannon, 1993).

#### *V. Capacitación espermática*

La capacitación espermática acontece durante la progresión de los espermatozoides por la región caudal del istmo del oviducto. Se ha observado que la capacitación espermática se produce principalmente por los cambios en los patrones de fosforilación de las proteínas de la membrana espermática (Petrunkina y cols., 2003; Albarracín y cols., 2004). Hay autores que sugieren que la capacitación ocurre debido a la interacción entre el espermatozoide y el oviducto, de tal manera que primero se selecciona al espermatozoide, luego se mantiene en un estado de baja capacitación y finalmente se capacita (Petrunkina y cols., 2003). En estudios realizados para determinar la capacitación espermática *in vitro*, se ha descubierto que es posible que se produzca en un medio sin la adición de glucosa ni de ningún otro azúcar como fuente de energía (Petrunkina y cols., 2003; Albarracín y cols., 2004).

La proporción de espermatozoides con un movimiento hiperactivo puede estimarse subjetivamente mediante el uso de un microscopio óptico o de una forma más objetiva utilizando el sistema CASA (Rota y cols., 1999b). Solamente los espermatozoides vivos con acrosomas reactivos se consideran capaces de capacitarse y alcanzar el último paso de la desestabilización; este acontecimiento se conoce como la reacción acrosomal (Peña, 2004).

En la especie canina, se comprobó que la adición de fluoresceinated lectins *Pisum sativatum* agglutinin (PSA) y peanut agglutinin (PNA) era altamente tóxica cuando se añadía a muestras de semen incubadas en condiciones de capacitación; sin embargo, no se detectaba ninguna toxicidad cuando las muestras de semen tanto fresco como congelado eran incubadas en un TRIS-buffer o en el diluyente de criopreservación, respectivamente (Peña, 2004).

#### VI. *Neutrófilos y macrófagos*

Por lo general, proceden de la flora que se sitúa sobre la pared del pene y el prepucio, aunque en ocasiones pueden provenir de la próstata. En el caso concreto de los macrófagos, pueden adherirse a los espermatozoides, mientras que los neutrófilos no suelen afectar a la movilidad de la muestra (Allen, 1992).

#### VII. *Eritrocitos*

Se suelen presentar con frecuencia en el eyaculado de ejemplares mayores de 5 años, proceden de la próstata, siendo indicativo de una enfermedad clínica. La presencia de eritrocitos en el eyaculado también puede deberse a traumas accidentales que ocurren durante la monta natural o la recogida manual y que se encuentren afectando al pene o al prepucio. Ocasionalmente se presentan en la primera recogida, cuando el animal es muy joven o en animales viejos que tengan alguna neoplasia testicular (Rijsselaere y cols., 2004). Aunque se presenten en número elevado, no suelen afectar a la motilidad seminal del semen fresco o refrigerado (Allen, 1992; Rijsselaere y cols., 2004); sin embargo, la presencia de un 2% (v/v) de sangre en el semen que va a ser congelado, afecta negativamente a la motilidad y al estado del acrosoma (Rijsselaere y cols., 2004).

#### 2.3.2.3. Características bioquímicas

##### I. *pH*

El pH de semen canino es más ácido que el de los rumiantes con un valor de 6.3 (Iguer-ouada, 2001). La motilidad seminal se ve disminuida por variaciones en el pH, tanto con pH ácidos como básicos. Por lo tanto, este aspecto debe valorarse especialmente a la hora de preparar los diluyentes y las sustancias tampón que se utilizarán en los procesos de diluyo-conservación seminal, obteniendo los mejores resultados con rangos de pH de 6.9-7.1 (England, 1993).

## II. *Osmolaridad*

La osmolaridad influye sobre la presión osmótica y en el punto crioscópico de una solución. El semen canino presenta un punto crioscópico de  $-0.55\text{ }^{\circ}\text{C}$ , que equivale a una concentración de 300mOsm (Peña, 1997). Las tres fracciones del eyaculado presentan valores de osmolaridad diferentes, siendo el valor medio para la primera fracción de 315mOsm, 308 para la segunda y 301 en la tercera (Iguer-ouada, 2001). Las observaciones que se han realizado denotan que los diluyentes hipertónicos son menos perjudiciales que los hipotónicos, ya que actúan reduciendo el contenido de agua intracelular antes de la congelación, por lo que disminuyen la formación de hielo intracelular.

### 2.3.3. Factores que influyen sobre las características seminales

#### 2.3.3.1. Individuo y raza

En los rumiantes se han establecido una serie de variantes que afectan a la congelabilidad del semen. No se conocen las causas, pero parece muy probable que la predisposición a la congelación oscile tanto con el individuo, como con la raza, ya que en carneros y machos cabríos se ha establecido que existen estas diferencias (England, 1993; Cabrera, 1999).

Hay autores que han conseguido demostrar una aparente relación entre la raza y la calidad del segundo eyaculado. En el Pastor Alemán se obtiene un mayor volumen seminal y una mayor concentración total cuando se realiza una segunda recogida, en comparación con otras razas. Sin embargo, el resto de los parámetros no se ven afectados y la motilidad y la concentración/ml presentan valores inferiores a otras razas. Asimismo, las reservas espermáticas del epidídimo están influidas por el tamaño del animal (England, 1999).

Más recientemente, diferentes trabajos en la especie canina, han establecido diferencias individuales en la calidad seminal post-congelación, partiendo de individuos que en fresco presentaban similares parámetros seminales (Nöthling y Shuttleworth, 2005; Batista y cols., 2006).

#### 2.3.3.2. Estado de ánimo y ambiente

En la especie canina, se ha demostrado que el miedo y el pánico a determinadas situaciones y ambientes impiden que se produzca una erección completa y por consiguiente que se pueda producir la eyaculación (Kutzler, 2005a).

Asimismo, los ejemplares excesivamente juguetones, tanto con la hembra en celo como con todas las personas presentes en el momento de la recogida, suelen presentar una incapacidad para conseguir que se produzca la erección (Kutzler, 2005a).

#### 2.3.3.3. Edad

En algunos trabajos se ha comprobado que la calidad seminal en animales menores de 6 meses no es muy buena, describiendo que la motilidad, morfología y la concentración mejoran a partir de esa edad (Schubert y Seager, 1991). Asimismo, otros autores afirman que la pubertad en la especie canina se alcanza a los 9 meses, siendo a partir de esta edad cuando la calidad seminal es mejor (Hewitt, 2000). Por otro lado, hay estudios donde se ha determinado que la concentración seminal es peor en animales mayores de 4 años, siendo este efecto más marcado a partir de los 5 años; sin embargo, no parece que el resto de parámetros seminales sufra alteración alguna (Tello y cols., 1988).

#### 2.3.3.4. Ritmo de recogida

Está perfectamente demostrado que una recogida seminal diaria produce una reducción de las reservas espermáticas en pocos días. Este fenómeno se incrementa si se realizan dos recogidas diarias (Boucher y cols., 1958). En cambio, se ha comprobado que si se obtienen dos eyaculados con escaso margen de tiempo entre recogidas, la motilidad total de la muestra es mayor que la motilidad de cada uno de los eyaculados por separado (England, 1999). Finalmente, otros estudios evidencian que si se realizan recogidas de semen cada 2 días, no ocurre una reducción significativa de las reservas espermáticas (England, 1999).

En cuanto al periodo de abstinencia, si es muy largo, puede generarse un envejecimiento de las reservas espermáticas, que se terminan excretando con el semen o la orina (Hewitt, 2000). Existen dos teorías sobre cual es el destino de los espermatozoides no eyaculados; en una se defiende que sufren un proceso de destrucción por parte de los espermiófagos presentes en el propio testículo y en el epidídimo para luego ser reabsorbidos; en la segunda se afirma que los espermatozoides se depositan en la uretra y se eliminan por la orina (Illera, 1984; Arthur, 1991).

## 2.4. CONSERVACIÓN DEL SEMEN CANINO

### 2.4.1. Semen fresco

En la especie canina, el semen obtenido tras estimulación manual se suele conservar en tubos calibrados de plástico o cristal hasta el momento de su utilización. Si la muestra se mantiene en un baño María a 37 °C, el semen fresco puede mantener su viabilidad hasta 24 horas tras la recogida. En el caso de que se suplemente con un diluyente a base de yema de huevo o leche homogeneizada a la que se le ha eliminado el albumen, junto con antibióticos, puede aumentar su vida media hasta 4-5 días siempre que se conserve a 37 °C (Arthur, 1991; Farstad, 2000b; Kutzler, 2005a). Si no es posible mantener la muestra atemperada, otros autores recomiendan que se deberá utilizar en un plazo máximo de 15 minutos, para evitar que se enfríe con demasiada rapidez, ya que se produce un detrimento importante de su calidad (Allen, 1992).

### 2.4.2. Semen refrigerado

Para mantener el semen en refrigeración hay que añadir al medio de dilución un componente que proteja a los espermatozoides del shock frío, observándose que los mejores resultados se obtienen con la yema de huevo. Generalmente, se almacena el semen en tubos calibrados de cristal o plástico, aunque en ocasiones se utilizan envases menos convencionales como frascos calibrados de cristal o plástico (Rota y cols., 1999a; Iguer-ouada, 2001; Iguer-ouada y Verstegen, 2001). La reactivación y prolongación de los parámetros de motilidad parece ser que se ve influenciada por la suplementación de glucosa, la adición de yema de huevo fresco y la eliminación de productos de degradación presentes en el medio (Verstegen y cols., 2005a). En cuanto a la glucosa, se ha observado que el aumento de este componente en el medio se encuentra relacionado con el porcentaje de espermatozoides estáticos. Asimismo, se ha comprobado que la baja motilidad espermática puede ser reactivada mediante la suplementación *in vitro* o *in vivo* de secreciones vagino-útero-oviductales (Verstegen y cols., 2005a).

En diversos estudios realizados en la especie canina se ha demostrado que añadiendo a la muestra de semen un diluyente a base de yema de huevo es posible mantener la viabilidad hasta 10 días a 4 °C, sin alterar su viabilidad. Aunque se desconoce exactamente cuál es el mecanismo de reactivación de la yema de huevo, se sabe que el sustrato energético de los espermatozoides lo aporta la adición de fosfolípidos y, probablemente, la yema de huevo se encuentre involucrada en la producción de estos cambios (Iguer-ouada, 2001; Iguer-ouada y Verstegen, 2001; Verstegen y cols., 2005a). No obstante, también existen otros trabajos donde

se afirma que la viabilidad del semen de perro refrigerado es de 4-5 días como máximo (Allen, 1992; England, 1999).

#### 2.4.3. Semen congelado

La principal ventaja de la crioconservación seminal es que ha supuesto una valiosa herramienta a la hora de distribuir la calidad genética tanto espacial como temporalmente. En las especies de abasto, la congelación del semen interesa básicamente por la capacidad productiva que se pueda obtener del animal (Arthur, 1991). No obstante, en la especie canina junto con la conservación de muestras seminales de perros con un alto valor genético, se encuentra la circunstancia que en el perro, debido a su condición de animal de compañía y al enorme valor afectivo para su propietario, la crioconservación seminal se encuentra indicada porque brinda al propietario la posibilidad de obtener descendencia de su mascota, incluso una vez que ésta haya fallecido.

El principal inconveniente de la crioconservación seminal es que durante los procesos previos a la congelación, los espermatozoides se ven sometidos a multitud de agresiones físico-químicas que provocan un detrimento de su capacidad fecundante (Andersen, 1980); por esta razón, se siguen desarrollando numerosos trabajos encaminados a obtener mayores tasas de supervivencia post-congelación que proporcionen mejores resultados de fertilidad.

Con respecto a la longevidad del semen congelado, en diferentes especies se ha valorado la influencia del tiempo de almacenamiento sobre la viabilidad del semen. Parece evidente que el metabolismo celular se ralentiza con el descenso de la temperatura, hasta casi detenerse a temperaturas de congelación. En la especie caprina, diferentes estudios han confirmado que, conforme se incrementaba el tiempo de conservación se producía una reducción significativa de la motilidad espermática y un incremento de las morfoanomalías y, en consecuencia, una disminución de la fertilidad (Leboeuf y cols., 2000). No obstante, en vacuno se han conseguido gestaciones tras inseminar utilizando semen almacenado en nitrógeno líquido durante 20 años (Arthur, 1991). En la especie canina se han constatado el nacimiento de camadas a partir de semen congelado (Silva y cols., 1996; Linde-Forsberg y cols., 1999), pero hasta el momento no hay estudios que determinen el tiempo máximo de almacenaje que garantice altos porcentajes de fertilidad.

En algunos trabajos se ha demostrado que no existen diferencias significativas en los parámetros de motilidad, reacción acrosomal e integridad de membrana post-congelación, cuando el semen es sometido a un proceso de congelación inmediatamente tras la recogida o tras permanecer 2 días refrigerado con un diluyente a base de TRIS-glucosa con yema de huevo (Verstegen y cols., 2005 b).

#### 2.4.3.1. Contratación y selección de eyaculados

Los parámetros básicos a evaluar para decidir si una muestra de semen se debe someter al proceso de crioconservación serían la concentración, la motilidad, la vitalidad y las morfoanomalías (Thomas y cols., 1993; Silva y cols., 1996; Hay y cols., 1997a; Ivanova-Kicheva y cols., 1997; Rota y cols., 1999a; Peña y Linde-Forsberg, 2000a, b; Yildiz y cols., 2000).

En base a estos parámetros, se considera un semen de buena calidad cuando en fresco muestra una concentración comprendida entre  $300-700 \times 10^6$  esp/mL, una motilidad del 80-95%, un valor de vitalidad superior al 90% y un porcentaje de morfoanomalías inferior al 20% (Silva y Verstegen, 1995; Silva y cols., 1996; Hay y cols., 1997a; Iguer-ouada y Verstegen, 2001; Alamo y cols., 2005). Otros autores hacen referencia al uso de muestras seminales que presentan un porcentaje de motilidad superior al 70% (Thomas y cols., 1993; Rota y cols., 1999a; Yildiz y cols., 2000) o valores de concentración de  $150 \times 10^6$  esp/mL (Peña y Linde-Forsberg, 2000a, b).

En estudios recientes, se ha visto que la realización de un análisis computerizado de las células del semen probablemente representa el test más aceptado y válido para determinar la funcionalidad espermática de un eyaculado y, por lo tanto, predecir su integridad (Cinone y cols., 2005).

#### 2.4.3.2. Dilución de eyaculados

##### *I. Composición de los diluyentes*

El semen de cada especie tiene unas características especiales que impide que se desarrolle un diluyente universal. A pesar de esto, el diluyente debe reunir una serie de componentes que impida el deterioro de la muestra de semen y que básicamente son los siguientes:

- Agua bidestilada o ultrapura, como disolvente para el resto de componentes.



- Sustancias iónicas y no iónicas que aseguren el mantenimiento de la osmolaridad y pH del medio. En el semen canino, las más usadas son: citrato sódico, leche desnatada en polvo, leche desnatada uperizada, lactosa, ácido cítrico, TRIS (tris hidroximetil aminometano), TES (N-TRIS hidroximetil-2-aminometano ácido sulfónico), PIPES (piperazina etano ácido sulfónico) e hidróxido potásico (Badinand, 1990).

- Sustancias orgánicas que prevengan o amortigüen el shock frío, como la yema de huevo o leche (Foote, 1962; Jones, 1969).

- Agentes crioprotectores que garanticen la integridad celular ante los cambios de estado del agua principalmente. Presentan un doble mecanismo de acción; por un lado, disminuyen el punto crioscópico intracelular, con lo que disminuyen la concentración intracelular de solutos a bajas temperaturas al aumentar la cantidad de agua que permanece en estado líquido (Meryman, 1971) amortiguando así la toxicidad del medio (Cabrera, 1999) y, por otro lado, provocan la deshidratación celular mediante mecanismos de ósmosis que disminuye la formación de cristales de hielo intracelular (Watson, 1990) y extracelular durante la congelación, evitando poner en peligro la integridad de las membranas celulares (Cabrera, 1999). Los mejores resultados se han obtenido con el DMSO (dimetilsulfóxido) y el glicerol (Salamon, 1968). La concentración final de glicerol para la crioconservación del semen canino oscila entre 3-8% (Seager y Platz, 1977; Andersen, 1980; Olar, 1984; Badinnand, 1990; Peña y Linde-Forsberg, 2000a, b; Hewitt y cols., 2001). Si se añade únicamente DMSO no se observa una marcada mejoría con respecto a los resultados obtenidos con el glicerol (Olar, 1984).

- Azúcares simples como fuente de energía para los espermatozoides, o bien di- o tri-sacáridos como crioprotectores adicionales (Watson, 1990).

- Aditivos, como enzimas ( $\alpha$  y  $\beta$ -amilasa,  $\beta$ -glucuronidasa, catalasa), detergentes (SDS-dodecil sulfato sódico, STLS-trietanolamina laurel sulfato sódico), aminoácidos (alanina, prolina, glicina-betaína, glicina-betaína+prolina) y otros compuestos (cafeína, prostaglandinas) que pueden mejorar la fertilidad (Foote y Arriola, 1987; Watson, 1990; Thomas y cols., 1993; Peña y Linde-Forsberg, 2000a, b).

- Antibióticos, para evitar el crecimiento bacteriano (Watson, 1990).

## II. *Tipos de diluyentes*

Para la criopreservación de semen en la especie canina se han utilizado diversos diluyentes, algunos de los más habituales serían:

- Diluyente de Andersen: 240 mM TRIS, 63 mM ácido cítrico, 70mM fructosa, 8% glicerol, 20% yema de huevo y hasta 100 mL de agua destilada (Yildiz y cols., 2000; Hewitt y cols., 2001).

- Diluyente Upssala (Peña y Linde Forsberg, 2000a, b) integrado por dos diluyentes; diluyente 1: 2.4 g de TRIS, 1.4 g de ácido cítrico, 0.8 g de glucosa, 0.06 g de Na bencilpenicilina, 0.1 g de estreptomina sulfato, 20 mL de yema de huevo, 3 mL de glicerol y hasta 100 mL de agua destilada; diluyente 2: igual al diluyente 1, pero con 7% (v/v) de glicerol y un 1% (v/v) de Equex STM Paste. El uso del Equex STM Paste genera que los espermatozoides vivos tras la descongelación presenten una elevada concentración de calcio intracelular, siendo probable que este hecho sea un signo de criocapacitación y de funcionalidad espermática, manteniendo la motilidad y la vitalidad durante largos periodos de tiempo (Peña, 2004).

- Diluyente TRIS-fructosa: 2.4 g de TRIS, 0.36 g de ácido cítrico, 1.06 g de fructosa, 20% de yema de huevo, 8.8 mL de glicerol, 50000 UI de penicilina, 50 mg de estreptomina y hasta 100 mL de agua destilada. Este diluyente ha proporcionado buenos resultados cuando se congela en pajuelas de 0.5 mL (Ivanova-Kicheva y cols., 1997).

- Diluyente TRIS-glucosa: 2.24 g de TRIS, 1.15 g de ácido cítrico, 0.96 g de glucosa, 20% de yema de huevo, 6.0 mL de glicerol, 50000 UI de penicilina, 50 mg de estreptomina y hasta 100 mL de agua destilada. Se han observado buenos resultados cuando se emplea este diluyente en semen envasado en tubos de aluminio de 5 mL (Ivanova-Kicheva y cols., 1997).

- Diluyente a base de Lactosa: 11.5 g de lactosa, 20% de yema de huevo, 5 mL de glicerol, 50000 UI de penicilina, 50 mg de estreptomina y hasta 100 mL de agua destilada. Con este diluyente se ha envasado con éxito el semen tanto en pellets como en pajuelas (Ivanova-Kicheva y cols., 1997).

- Diluyente TRIS-citrato: 2.11 g TRIS, 0.98 g glucosa, 1.253 g ácido cítrico, 20 % yema de huevo, 50000 UI penicilina, 50 mg estreptomina y hasta 100 mL de agua destilada (Thomas y cols., 1993).

- Diluyente Laiciphos: 10 g Laiciphos, 20 mL yema de huevo, 8 mL glicerol y hasta 100 mL de agua destilada (Silva y Verstegen, 1995; Silva y cols., 1996).

#### 2.4.3.3. Proceso y tasa de dilución

La tasa de dilución a la que debe ser sometida una muestra de semen viene determinada por la concentración final necesaria que deben presentar las dosis seminales para obtener una buena tasa de fertilidad.

En el caso concreto del semen canino, la mayoría de los autores coincide en que la concentración normal en fresco oscila entre  $300-2000 \times 10^6$  esp/mL (Burke, 1986; Concannon, 1993; Iguer-ouada, 2001). En base a estas premisas, se han utilizado protocolos de dilución que permitan obtener una concentración final de  $50-200 \times 10^6$  esp/mL (Peña, 1997), si bien otros autores han utilizado diferentes tasas de dilución que oscilan entre 1:2 (Seager y cols., 1975), 1:5 a 1:10 (Andersen, 1980). La dilución depende del formato elegido para el envasado; así, en el caso de los pellets la dilución empleada es menor, 1:1 ó 1:2, mientras que se utilizarán diluciones de 1:4 a 1:10 en el caso de las pajuelas; con ello se consigue que cada pellet de 100  $\mu$ l o cada pajuela de 0.5 mL contenga una concentración seminal de  $50-200 \times 10^6$  esp/mL (Peña, 1997). Además, algunos autores realizan una centrifugación suave antes o durante la dilución para conseguir una mayor concentración seminal que permita reducir la relación diluyente: número de espermatozoides (Oettlé, 1982) y para eliminar el plasma seminal que puede resultar nocivo durante la congelación (Andersen, 1976; Seager y Platz, 1977).

El método más utilizado para el envasado del semen congelado son las pajuelas de 0.5 mL por su fácil manipulación, identificación, almacenamiento, transporte y descongelación (Thomas y cols., 1993; Silva y Verstegen, 1995; Hay y cols., 1997b; Rota y cols., 1999a; Peña y Linde-Forsberg, 2000a; Hewitt y cols., 2001). Sin embargo, otros estudios describen el uso de pajuelas de 0.25 mL (Thomas y cols., 1993; Yildiz y cols., 2000; Hewitt y cols., 2001), pajuelas de 2.5 mL (Thomas y cols., 1993), pellets de 100  $\mu$ l (Thomas y cols., 1993; Ivanova-Kicheva y cols., 1997), e incluso de tubos de aluminio de 5 mL (Ivanova-Kicheva y cols., 1997). Se ha llegado a la conclusión unánime de que independientemente del formato empleado, se pueden utilizar los mismos diluyentes y las mismas tasas de dilución sin que se aprecien diferencias significativas entre ellos, salvo un ligero incremento en la motilidad cuando se envasa en pellets (Seager, 1986). Lo único que debe tenerse en cuenta es que en función del envase seleccionado, las velocidades de congelación son completamente diferentes (England, 1993).

En general, la mayoría de los autores sostiene que la concentración final debe ser de  $100 \times 10^6$  esp/mL en cualquiera de los envases seleccionados (Thomas y cols., 1993; Silva y Verstegen, 1995; Silva y cols., 1996; Hay y cols., 1997a; Ivanova-Kicheva y cols., 1997; Rota y cols., 1999 a; Peña y Linde-Forsberg, 2000a, b; Yildiz y cols., 2000; Hewitt y cols., 2001). En estudios recientes se ha comprobado que el tamaño de la pajuela influye en la calidad seminal post-descongelación; de hecho, se demuestra que 60 minutos tras la descongelación, la motilidad era mayor y el porcentaje de acrosomías era más bajo cuando se utilizaban pajuelas de 0.5 mL con respecto a las de 0.25 mL (Nöthling y Shuttleworth, 2005).

En el perro, es frecuente realizar las diluciones iniciales a 37 °C o bien a temperatura ambiente para facilitar una equilibración fisiológica entre el semen y el diluyente (Peña, 1997). No se ha establecido un patrón a la hora de realizar la dilución; así, algunos autores diluyen en una sola etapa sin centrifugar previamente y a una concentración constante de  $80 \times 10^6$  esp/mL (Morton, 1988) o aplicando una centrifugación previa a 700 x g para finalmente diluirlo y obtener una concentración final de  $150 \times 10^6$  esp/ml (Farstad y Andersen, 1989). En otros estudios se hacen las diluciones en dos etapas para retrasar la incorporación del glicerol hasta que la temperatura de la muestra sea de 4 °C (Concannon y Battista, 1989) y, finalmente, hay estudios en los que se utilizan tres etapas de dilución de tal forma que se diluye el semen (1:5) realizando una centrifugación previa durante 5 minutos a 800 x g si el semen es poco concentrado, para obtener una concentración final de  $100 \times 10^6$  esp/mL (Badinand, 1990).

Diferentes estudios han demostrado que no existen diferencias significativas cuando se añade el diluyente glicerolado a 5 °C o a temperatura ambiente (Rohloff y cols., 1978). Por otro lado, se ha comprobado que el diluyente glicerolado puede incorporarse a temperatura ambiente y sin necesidad de hacerlo en varias etapas, ya que las muestras de semen no sufren grandes variaciones cuando el glicerol se añade en una sola etapa o en varias, tanto a temperatura ambiente como a 5 °C (Fontbonne y Badinand, 1993).

#### 2.4.3.4. Periodo de equilibración

Independientemente de las etapas de dilución empleadas, con la mayor brevedad posible, la muestra debe someterse a un descenso paulatino de temperatura para evitar que sufra daños por shock frío. El tiempo mínimo que debe permanecer el semen a 4-5 °C para garantizar que haya sucedido la reestructuración de las membranas que dotan a los espermatozoides de mayor resistencia frente a la congelación, es de 1 hora (Peña, 1997). En el caso del semen canino, se

pueden aplicar estas premisas (Concannon y Batista, 1989), aunque se trata de un semen tremendamente resistente al shock frío, que no presenta diferencias significativas en la supervivencia post-congelación entre periodos de equilibrado de 1, 2 ó 3 horas (Olar, 1984).

#### 2.4.3.5. Congelación en nitrógeno líquido

Este protocolo es el más estandarizado y utilizado para la congelación de semen. La mayoría de los autores disponen, para la congelación en nitrógeno líquido, de una caja de poliestireno con un estante de metal extraíble colocado a unos 4-8 cm de la superficie del nitrógeno líquido. Las pajuelas se colocan horizontalmente en el estante y se dejan entre 8-15 minutos bajo los efectos de los vapores de nitrógeno líquido cuya temperatura oscila entre -110 y -120 °C, para finalmente sumergir las pajuelas en el nitrógeno líquido a -196 °C (England y Ponzio, 1996; Peña y Linde-Forsberg, 2000a, b; Farstad, 2000b; Alamo y cols., 2005). Otros autores depositan las pajuelas en un estante de metal, dejando el semen durante 15 minutos expuesto a los vapores de nitrógeno líquido que se encuentra a -140 °C, para sumergirlas y conservarlas posteriormente en nitrógeno líquido (Ivanova-Kicheva y cols., 1997). Asimismo, en otros estudios, donde previamente se había descendido lentamente la temperatura desde 38 °C hasta 0 °C colocando las muestras en hielo picado, se utiliza un congelador de alcohol que se encuentra programado para que ocurra un descenso paulatino de la temperatura hasta alcanzar -70 °C, sumergiendo finalmente las muestras en nitrógeno líquido (Hay y cols., 1997a).

En el caso de congelación en pellets, el método de descenso de temperatura que utilizan la mayor parte de los autores es el hielo seco, depositando la muestra durante 30 minutos antes de introducirla en nitrógeno líquido (Thomas y cols., 1993).

En general, la velocidad óptima de congelación depende en gran medida del tipo de crioprotector y su concentración, del diluyente y de la geometría del envase. El aumento de la concentración del crioprotector permite disminuir la velocidad de congelación. No se ha definido con exactitud un modelo definitivo sobre el efecto de la velocidad de congelación sobre la supervivencia del semen canino. Se han desarrollado diversos estudios comparando velocidades de descenso de temperatura diferentes y, aunque no son concluyentes, se ha visto que se obtiene mayor supervivencia cuando se emplean velocidades lentas; en general, se obtienen buenos resultados cuando se utiliza una velocidad de congelación moderada -5 °C/min desde 5 a -15 °C y -20 °C/min desde -15 a -100 °C (Watson, 1995; Hay y cols., 1997b; Peña y Linde-Forsberg 2000a).

#### 2.4.3.6. Congelación en ultracongeladores

Recientemente se han realizado varios estudios que describen el uso de ultracongeladores como técnica alternativa al uso de nitrógeno líquido. El primer estudio, realizado en la especie caprina, demostró la eficacia de los ultracongeladores de  $-152\text{ }^{\circ}\text{C}$  como un método eficaz de criopreservación seminal hasta 2 meses post-congelación (Medrano y cols., 2002).

Posteriormente, se han realizado dos experiencias en semen canino; en la primera de ellas se utilizó un *pool* de semen de 3 ejemplares mestizos, comprobando la calidad seminal hasta 4 meses post-congelación (Álamo y cols., 2005). En el segundo estudio, realizado en la raza Dogo Canario, se crioconservó semen de manera individual, valorando las características seminales post-congelación hasta 8 meses tras la congelación (Batista y cols., 2006).

El procedimiento descrito por estos autores consistía en que una vez sometidos los eyaculados a los procesos de contrastación y dilución, el semen se envasaba en pajuelas de 0.5 mL, y en este momento se realizaban tres tratamientos: (i) Las pajuelas tras permanecer 15 minutos bajo los efectos de los vapores de nitrógeno líquido a  $-110$  ó  $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$  se sumergieron en el nitrógeno líquido; (ii) similar al tratamiento previo, pero finalmente las pajuelas se retiraban de los vapores del nitrógeno líquido y se conservaban en el ultracongelador de  $-152\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; (iii) Las pajuelas se introdujeron directamente desde la cámara frigorífica a  $4^{\circ}\text{C}$  al ultracongelador de  $-152^{\circ}\text{C}$  (Álamo y cols., 2005; Batista y cols., 2006).

En estos estudios, cuando se realizaba la comparación de los tres tratamientos, se observaba que la criopreservación del semen en los ultracongeladores de  $-152^{\circ}\text{C}$  es una técnica que proporciona unos resultados completamente satisfactorios. Se comprobó que las características seminales post-congelación *in vitro* no eran significativamente diferentes entre los tres tratamientos utilizados, concluyendo que el uso de los ultracongeladores de  $-152^{\circ}\text{C}$  no sólo representa una técnica alternativa para la criopreservación seminal, sino que es un método más sencillo de realizar (Medrano y cols., 2002; Álamo y cols., 2005; Batista y cols., 2006).

Asimismo, se ha definido el descenso de temperatura que acontece en el ultracongelador de  $-152\text{ }^{\circ}\text{C}$ , observando que existe una lenta disminución de la temperatura de  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  desde  $5$  a  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para posteriormente producirse un descenso más rápido de  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  desde  $-10$  a  $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para finalmente mostrar una velocidad de descenso de  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  desde  $-100$  a  $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Álamo y cols., 2005).

#### 2.4.4. Descongelación

##### 2.4.4.1. Procedimiento

Existe unanimidad entre los autores en que las pajuelas de 0.5 mL deben descongelarse mediante un baño María, aunque existen diferentes opciones en cuanto a tiempo y temperatura. Así, hay autores que describen temperatura de 37 °C durante 15 seg (Peña y Linde-Forsberg, 2000a, b), 37 °C durante 30 seg (Thomas y cols., 1993), 39 °C durante 30 seg (Hewitt y cols., 2001), 50 °C durante 30 seg (Silva y cols., 1996), 70 °C durante 6 seg (Hay y cols., 1997a, b) y 70 °C durante 8 seg (Allen, 1992; Rota y cols., 1999a; Farstad, 2000a, b; Peña y Linde-Forsberg, 2000a, b).

Si se utilizan pajuelas de 0.25 mL, hay autores que descongelan a 37 °C durante 30 seg (Yildiz y cols., 2000) o bien a 39 °C durante 30 seg (Hewitt y cols., 2001), mientras que si se envasa en pajuelas de 2.5 mL se descongela a 50° C durante 45 seg (Thomas y cols., 1993). En el caso de los pellets, se sumergen en 0.5 mL de una solución con 0.9% de cloruro sódico a 55 °C durante 5 seg y, finalmente, el semen congelado en tubos de aluminio se descongela a 65 °C durante 15 seg, agitando vigorosamente el envase (Ivanova-Kicheva y cols., 1997).

Las pajuelas descongeladas se diluyen en 1-4 mL de una sustancia tampón para conseguir una mayor motilidad y vitalidad post-descongelación. Esta dilución se realiza independientemente de si el semen va a ser utilizado para la realización de pruebas de valoración y contrastación seminal, como si se destina para la realización de técnicas de inseminación artificial. Hay descritas varias sustancias tampón, así algunos trabajos proponen el uso de 4 mL de *ovine fresh buffer* con gentamicina (Silva y cols., 1996) y en otros (Peña y Linde-Forsberg, 2000a, b; Aalmo y cols., 2005) se recomienda 1-2 mL de TRIS buffer (2.4g TRIS, 1.4 g ácido cítrico, 0.8 g glucosa, 0.06 g Na bencilpenicilina y 0.1 g estreptomocina sulfato en 100 ml de agua destilada).

##### 2.4.4.2. Contrastación del semen congelado-descongelado

Los parámetros básicos valorados por la mayoría de los autores para valorar la calidad post-descongelación en el semen canino son la motilidad y la vitalidad (Thomas y cols., 1993; Silva y Verstegen, 1995; Hay y cols., 1997a; Rota y cols., 1999a; Peña y Linde Forsberg, 2000a, b).

Las técnicas de valoración son las mismas que para el semen en fresco. Se describen valores muy variables de motilidad post-descongelación en semen canino, pero, en general, se

considera que un semen presenta una calidad aceptable cuando el porcentaje de motilidad es superior al 60% (Silva y Verstegen, 1995; Silva y cols., 1996; Hay y cols., 1997a, b; Peña y Linde-Forsberg, 2000a, b). No obstante, en algunos trabajos se han obtenido resultados con un 40% de motilidad (Thomas y cols., 1993; Rota y cols., 1999a; Peña y Linde-Forsberg, 2000a, b).

En el caso de la vitalidad, la mayoría de los autores aceptan como buenas aquellas muestras que presentan una vitalidad superior al 80% (Silva y Verstegen, 1995; Silva y cols., 1996; Rota y cols., 1999a). Menos frecuentemente se valora el porcentaje de morfoanomalías y su valor debería situarse en menos de un 20-25% (Silva y cols., 1996; Álamo y cols., 2005).

#### 2.4.4.3. Estimulación de la motilidad espermática post-descongelación

La criopreservación genera una reducción importante de la motilidad espermática. Por esta razón, se han desarrollado estudios para proponer una serie de componentes moleculares que propicien la reactivación del movimiento de los espermatozoides una vez descongelados. Se ha observado que esta función la realizan compuestos como la cafeína, la teofilina y la pentoxifilina; también se describe el uso de factores endógenos extraídos de la zona pelúcida, de las secreciones oviductales o de los propios testículos (Iguer-ouada, 2001).

Se ha observado que cuando la muestra de semen se suplementa con plasma sanguíneo de una hembra, se produce una inhibición inicial de diferentes parámetros de la motilidad para luego ocurrir una estimulación secundaria, independiente del momento del ciclo estral en que se tome la muestra de plasma. La misma evolución ocurre cuando se suplementa con las secreciones uterinas, pero sin que se produzca la inhibición inicial (Verstegen e Iguer-ouada, 2005). Otros trabajos obtienen valores elevados de motilidad cuando las muestras se diluyen en el propio fluido prostático, probablemente porque este fluido favorece el ascenso de los espermatozoides por el tracto genital femenino (Rijsselaere y cols., 2003).

En estudios recientes, se ha comprobado que la criopreservación reduce la respuesta del semen a la estimulación con progesterona, cuya misión es propiciar la reacción del acrosoma; esto es debido a que los procesos de congelación seminal provocan una escasa presencia de receptores de progesterona en los espermatozoides y/o modifican estos receptores, generando un mal funcionamiento de los espermatozoides que conlleva una baja fertilidad seminal (Cheng y cols., 2005).



## 2.5. INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

### 2.5.1. Ventajas

La mayor ventaja que presenta la inseminación artificial (IA) es que, al ser necesario la extracción seminal, permite realizar una valoración de la calidad espermática, mientras que en el caso de la monta natural se parte de la hipótesis de que el semental es potencialmente fértil (Illera, 1984). Por otro lado, es muy factible que se pueda inseminar a más de una hembra con un mismo eyaculado (Farstad, 2000a; Eilts y cols., 2005).

Otro aspecto fundamental es que la IA permite obtener descendencia de individuos que son incapaces de aparearse de forma natural (Allen, 1992; Farstad, 2000a, b). En general, esta situación puede producirse debido a problemas de tipo psicológico, tales como inexperiencia sexual, temor a la desaprobación humana, falta o exceso de familiaridad con el lugar, etc... Otra posibilidad es que el animal padezca alguna patología adquirida que dificulte el apareamiento, como por ejemplo la artrosis, o bien se trate de una característica racial que limite o impida la monta natural (Allen, 1992; Eilts y cols., 2005).

Asimismo, esta técnica disminuye notablemente el estrés al que se ven sometidos los animales debido al hecho de viajar, así como también es una técnica apropiada para evitar la transmisión de enfermedades de tipo sexual. Además, permite utilizar el semen de ejemplares de diferentes regiones geográficas, sin tener que someterlo al periodo de cuarentena que exigen determinados países (Allen, 1992; Farstad, 2000b; Eilts y cols., 2005).

Finalmente, debido a la técnica de criopreservación seminal, es posible conservar y utilizar el semen incluso tras la muerte de donante (Allen, 1992; Farstad, 2000a).

### 2.5.2. Inconvenientes

Como ocurre con cualquier otra técnica, se requiere de personal cualificado para la realización de la IA que garantice una alta probabilidad de éxito (Arthur, 1991; Eilts y cols., 2005). Además, deben realizarse pruebas que determinen el momento del ciclo sexual en que se encuentra la hembra, tales como frotis vaginales para analizar el patrón celular que nos revela en que estado está el ovario o bien, mediante la determinación de los niveles de progesterona en plasma o suero (Farstad, 2000a).

Finalmente, aunque es una buena herramienta para el control de las enfermedades de transmisión sexual, hay enfermedades capaces de transmitirse por IA, especialmente si el agente etiológico es resistente a los antibióticos presentes en los diluyentes (Eilts y cols., 2005).

### 2.5.3. Requisitos del semen

La IA requiere disponer de una dosis de semen que presente entre 100-400 x 10<sup>6</sup> esp. Si la inseminación es intrauterina se podrían utilizar dosis con una concentración de 100 x 10<sup>6</sup> esp, mientras que si la IA es intravaginal profunda, hay que aumentar la dosis (Peña, 1997; Linde-Forsberg y cols., 1999).

Dependiendo de la dosis de inseminación, el envasado del semen se presenta en concentraciones de 50-200 x 10<sup>6</sup> esp/mL en función de la técnica de congelación (Peña, 1997; Linde-Forsberg y cols., 1999; Eilts y cols., 2005).

### 2.5.4. Técnica de inseminación artificial

#### 2.5.4.1. Semen fresco

La inseminación artificial con semen fresco sin diluir es la más utilizada en el perro y se suele realizar el día de la ovulación y se hace una segunda inseminación a los 2 días (Farstad, 2000b). El semen de la especie canina puede mantenerse fértil hasta 7 días en el interior del tracto reproductivo de la hembra. Hay estudios que demuestran que el mayor porcentaje de espermatozoides depositados mediante inseminación artificial se localizan en las criptas uterinas y en la unión útero-tubárica, obteniéndose los mejores porcentajes cuando la hembra se insemina durante la ovulación (Linde-Forsberg y cols., 1999; Daniels y Mundell, 2005; Eilts y cols., 2005; Rijsselaere y cols., 2005a).

La técnica de inseminación consiste en depositar el semen en el interior de la vagina utilizando una pipeta rígida de plástico, con una longitud adecuada en función del tamaño de la hembra. A esta pipeta se le adapta una jeringuilla de 2-5 mL, preferiblemente sin émbolo de goma que puede resultar tóxico para los espermatozoides, incluso se describe el uso de jeringuillas de cristal. Para evitar el reflujo, no es conveniente depositarse más de 3 mL de semen en hembras grandes o de 2 mL en las pequeñas (Farstad, 2000a, b; Eilts y cols., 2005).

El primer paso consiste en la exploración y desinfección de la zona genital externa con la hembra en estación sobre la mesa. Se eleva ligeramente la vulva con el dedo índice y se avanza

lentamente con el catéter por el interior de la vagina hasta el cervix; en este momento se eleva la parte exterior del catéter para conseguir que el semen discurra por la pared dorsal de la vagina sin que se introduzca en el meato urinario. En hembras que lo permitan, porque no se ponen rígidas o no están obesas, se debe controlar la inserción del catéter mediante palpación transabdominal del cervix (Fontbonne y Badinand, 1993; Silva y cols., 1996; Linde-Fosberg y cols., 1999; Farstad, 2000a).

El semen debe depositarse lentamente y, a continuación, se elevan los cuartos traseros de la hembra durante unos 10-15 minutos aproximadamente, realizando un ligero masaje vulvar que ha demostrado ser beneficioso porque favorece las contracciones uterinas y el transporte del semen. Asimismo, debe evitarse que en los primeros 15 minutos tras la inseminación, la hembra miccione o adopte posturas que puedan favorecer la salida del semen desde la vagina. Mediante la inseminación intravaginal profunda, se obtiene un 60-90% de gestaciones positivas y la concentración mínima que se debe aplicar es de  $200 \times 10^6$  esp (Fontbonne y Badinand, 1993; Silva y cols., 1996; Linde-Fosberg y cols., 1999; Farstad, 2000b; Eilts y cols., 2005).

Aunque es una técnica menos utilizada por los clínicos, también es posible realizar la deposición del semen directamente en el útero. Para realizar esta técnica se coloca a la hembra en estación sobre la mesa, se introduce el catéter de inseminación a través de la vulva y se avanza por el interior vaginal; simultáneamente se va realizando una palpación transabdominal de la trayectoria del catéter hasta localizar el cuello del útero; la duración de este proceso debe ser inferior a 1 minuto en un operador experimentado. Durante el estro, el cuello permanece bastante abierto; esta circunstancia unida a que su trayectoria es recta, favorece que se pueda atravesar con facilidad, sin que los pliegues presentes en la mucosa sean un impedimento. El catéter puede ser un vaina de nailon en cuyo interior hay un catéter metálico o bien un catéter de Farstad; en ambos casos se les une una jeringuilla con la dosis seminal. En general, no es una técnica molesta, por lo que no suele ser necesario sedar o tranquilizar a la hembra (Wilson, 1993; Farstad, 2000a, b; Wilson, 2001; Eilts y cols., 2005). Esta técnica evita el impedimento mecánico que representa el paso de los espermatozoides a través del cuello uterino; asimismo, no es necesario elevar los cuartos traseros del animal después de depositar el semen, si bien algunos autores lo recomiendan. El porcentaje de gestaciones obtenido con esta técnica es superior al observado en la inseminación intravaginal profunda y la dosis de inseminación recomendada es de  $100 \times 10^6$  esp (Silva y cols., 1996; Farstad, 2000a, b; Eilts y cols., 2005).

Otro procedimiento más tecnificado, es la realización de una IA intrauterina por vía transcervical, con la ayuda de un fibroendoscopio que permita visualizar el orificio cervical. Una vez localizado el cervix, se inserta un catéter a través del cuello uterino y se inyectan las dosis seminales; si el catéter se ha insertado correctamente, no se produce reflujo de semen. Este procedimiento tiene como ventaja que se puede reducir la dosis de inseminación, y no es tan necesario mantener elevados los cuartos traseros del animal. El porcentaje de gestaciones utilizando este procedimiento con semen fresco o refrigerado oscila entre un 80 y 100% (Silva y cols., 1996; Wilson, 2001; Eilts y cols., 2005).

#### 2.5.4.2. Semen congelado

Cuando el semen es congelado, la IA se retrasa 1-2 días después de la ovulación y se repite otra inseminación 1 día después (Farstad, 2000b). Esto se debe a que los procedimientos de congelación-descongelación afectan a la estabilidad del acrosoma y de las membranas provocando que el tiempo de capacitación sea menor y, además, el semen congelado es menos longevo que el fresco. Para garantizar al máximo la fecundidad, sólo deberían usarse muestras con más de un 50% de motilidad post-congelación y depositar la muestra dentro de los 10 minutos siguientes a su descongelación (Fontbonne y Badinand, 1993; Linde-Forsberg y cols., 1999; Farstad, 2000a; Eilts y cols., 2005).

Cuando se utiliza semen congelado, aunque es posible realizar una IA intravaginal profunda y obtener gestaciones, la mayoría de los autores recomiendan una IA intrauterina (Nöthling y cols., 1995; Silva y cols., 1996; Linde-Forsberg y cols., 1999; Farstad, 2000a; Eilts y cols., 2005). La inseminación intrauterina se puede realizar mediante los procedimientos antes descritos (catéter rígido y/o con la ayuda de un fibroendoscopio) o bien mediante la realización de una laparoscopia, que permiten depositar el semen directamente en el lumen uterino, pero que tiene otras desventajas evidentes como son la necesidad de someter al animal a una intervención quirúrgica con anestesia gaseosa, y definir con máxima precisión el momento óptimo de inseminación para reducir al mínimo este tipo de intervenciones (Eilts y cols., 2005). Con semen congelado se han obtenido tasas de gestación que oscilan desde un 55% hasta un 90%, si bien existe mucha variabilidad con respecto al número de inseminaciones realizadas, el número de dosis/inseminación y la concentración de espermatozoides/inseminación (Fontbonne y Badinand, 1993; Silva y cols., 1996; Linde-Forsberg y cols., 1999; Farstad, 2000a, b; Eilts y cols., 2005).

## 2.6. ANATOMÍA DEL APARATO REPRODUCTOR FEMENINO EN LA ESPECIE CANINA

El aparato reproductor en la perra presenta una anatomía similar al de las hembras de otras especies domésticas. Estructuralmente podemos distinguir vulva, vagina, útero y ovarios.

### 2.6.1. Vulva

Está constituida por los labios y la abertura de la vulva. Presenta una comisura dorsal y otra ventral que representan los puntos de unión de los labios de la vulva. Los labios de la vulva están formados fundamentalmente por tejido conectivo adiposo, y están flanqueados dorsolateralmente por un denso pliegue cutáneo. En la vulva se encuentra la salida al exterior tanto de las vías urinarias como del genital. La hendidura de la vulva aparece más abierta dorsalmente (Gil y cols., 1997; Ruberte y Sautet, 1998; Sandoval, 2000; Johnston y cols., 2001).

### 2.6.2. Vagina

#### *I. Fosa del clítoris*

Es un saco cutáneo situado en la cara ventral del vestíbulo de la vagina y en cuyo interior se localiza el clítoris. En la perra, esta fosa está bien diferenciada. Se encuentra circundada por el prepucio del clítoris, que está formado por parte de la mucosa vestibular y en parte por mucosa de la comisura ventral de los labios (Gil y cols., 1997; Sandoval, 2000).

#### *II. Clítoris*

Aunque es de menor tamaño, es el homólogo al pene del perro. La proyección del clítoris es en sentido caudodorsal en la fosa. El tejido eréctil que constituye su base anatómica se inicia en los pilares del clítoris que arrancan del arco isquiático; se continúa caudoventralmente con un tejido conectivo-adiposo que forma el cuerpo del clítoris y termina hacia la comisura ventral de los labios vulvares (Allen, 1992; Gil y cols., 1997; Sandoval, 2000; Johnston y cols., 2001).

#### *III. Vestíbulo de la vagina*

El vestíbulo vaginal es una estructura común para el aparato urinario y el genital. Se extiende desde el orificio externo de la uretra hasta los labios vulvares. Rodeando al vestíbulo vaginal se encuentra el músculo constrictor del vestíbulo que es de fibra estriada y representa el fascículo craneal del músculo bulboesponjoso en la hembra. Condensados en las paredes del vestíbulo suelen desarrollarse manifiestos plexos venosos de naturaleza eréctil y que reciben el nombre de

bulbos del vestíbulo. Además, existen agrupaciones de glándulas mucosas cuyas secreciones lubrican para facilitar la copulación y el parto (Gil y cols., 1997; Johnston y cols., 2001).

En el suelo del vestíbulo vaginal se encuentra el tubérculo uretral; en cuyo interior se localiza el orificio externo de la uretra que representa la abertura de la uretra hacia el vestíbulo. En el caso concreto de la perra, aparece en la línea media del suelo del vestíbulo vaginal, inmediatamente caudal a un pliegue transversal de la mucosa que marca el límite vagino-vestibular en forma de estrecha escotadura (Allen, 1992; Gil y cols., 1997; Sandoval, 2000).

#### *IV. Vagina propiamente dicha*

Representa el órgano copulador de la perra y su longitud es relativamente larga, hasta 10 cm en función de la raza. La cavidad vaginal es un órgano tubular que se extiende longitudinalmente por la cavidad pelviana, interpuesta entre el recto dorsalmente y el cuello de la vejiga y uretra ventralmente, mostrando como límite craneal el cuello del útero y caudalmente está limitada por el vestíbulo de la vagina. La extensión real va desde el cuello del útero hasta el orificio externo de la uretra. Debido a la posición oblicua del cuello del útero, la pared dorsal es más corta que la ventral. El espacio craneoventral de la vagina que se sitúa en el cuello del útero recibe el nombre de fórnix de la vagina, mientras el límite caudal de la mucosa vaginal está representado por el himen, que es un pliegue circular muy poco desarrollado, casi rudimentario. La mucosa vaginal, también llamada túnica de la mucosa vaginal, está constituida por una serie de pliegues longitudinales, formados por un epitelio escamoso que sufre modificaciones durante el proestro y estro en la especie canina (Lindsay, 1983; Allen, 1992; Ruberte y Sautet, 1998; Sandoval, 2000).

### 2.6.3. Útero

#### *I. Cervix o cuello del útero*

El cuello uterino es la estructura del aparato genital que une la vagina con el cuerpo del útero, es cilíndrico y del mismo calibre que el cuerpo. Su longitud es de 1 a 2 centímetros y se proyecta hacia la vagina. La luz del cervix cruza diagonalmente la unión úterovaginal, con lo que el orificio externo del cuello se encuentra en el suelo de la vagina, mientras que el interno se localiza en el techo del cuerpo del útero. Su interior está recorrido por un estrecho canal cervical o canal del cuello uterino, el cual está siempre cerrado, salvo durante el estro o en el momento del parto. Al igual que ocurre con la vagina, la túnica mucosa que se encuentra en el interior del cuello del útero presenta multitud de pliegues, sus paredes son densas, ocupando prácticamente todo su espesor (Evans y Christensen, 1993; Gil y cols., 1997; Sandoval, 2000; Johnston y cols., 2001).

## *II. Cuerpo del útero*

El cuerpo del útero es muy corto, la cara dorsal se relaciona con el recto, mientras que la opuesta se enfrenta con la vejiga de la orina. Los bordes derecho e izquierdo que limitan dichas caras se definen como los bordes del útero, donde llega a insertarse la parte más caudal del mesometrio (Gil y cols., 1997; Sandoval, 2000).

## *III. Cuernos uterinos*

Es el tracto más desarrollado y aparente de los conductos genitales femeninos. Los dos cuernos del útero reciben en su extremidad craneal la terminación de la correspondiente trompa uterina, con la que se comunica mediante el orificio uterino. En una hembra no gestante, los cuernos uterinos son más o menos simétricos y convergen caudalmente hacia el cuerpo del útero; se encuentran suspendidos desde ambos lados de la pared dorsolateral de la cavidad pelviana por el mesometrio o ligamento ancho del útero. En la especie canina, los cuernos uterinos miden entre 10 y 15 cm, dependiendo de la raza y la edad, siendo su trayecto bastante rectilíneo, pues sólo están ligeramente curvados centralmente hacia su tercio medio. Los cuernos uterinos de la perra no llegan a diferenciar un ligamento intercornual, pero sí presenta un velo uterino, por lo tanto, es un útero de tipo bicornes y *subseptus* (Allen, 1992; Evans y Christensen, 1993; Sandoval, 2000).

En hembras no grávidas, los cuernos uterinos incrementan su tamaño y peso cuando la perra manifiesta el proestro y el estro, si bien alcanza su máximo peso y volumen durante el diestro temprano, para entonces comenzar a disminuir cuando la perra entra en anoestro (Sokolowski y cols., 1973; Sandoval, 2000). Las glándulas endometriales muestran una notable proliferación durante el diestro, su epitelio se engruesa durante el proestro, estro y diestro temprano, para comenzar a disminuir en diestro tardío y en el anoestro (Sokolowski y cols., 1973; Evans y Christensen, 1993; Vázquez y cols., 2000).

## *IV. Trompas uterinas*

Los oviductos o trompas uterinas constituyen el primer tramo de los conductos genitales femeninos. Son unos conductos estrechos, sinuosos y músculomembranosos, que siempre se localizan adyacentes al ovario correspondiente. Durante el estro, la mucosa de las trompas uterinas alcanza su máximo estado de hipertrofia y diferenciación (Sandoval, 2000; Johnston y cols., 2001). La trompa uterina se encuentra englobada en un pliegue seroso propio (mesosalpinx) desde su extremo libre hasta su unión con el cuerno uterino, con lo que aparece

suspendido desde el mesovario. En el caso de la perra, la terminación útero-tubárica es brusca, de manera que la extremidad ístmica de la trompa asoma en el interior del cuerno, formando una papila que se corresponde con el orificio uterino de la trompa, que dificulta tanto el acceso de los espermatozoides como del huevo en sentido opuesto (Sandoval, 2000; Vázquez y cols., 2000).

#### 2.6.4. Ovarios

Existen dos ovarios, su morfología es más o menos ovoidea, situados en la región dorsocaudal del abdomen, inmediatamente caudales a los riñones correspondientes. En la perra, los ovarios son planos, alargados, de superficie nodular y suspendidos por un corto mesovario centralmente a las 3<sup>a</sup>-4<sup>a</sup> vértebras lumbares (Vázquez y cols., 2000). Los ovarios, cuando están sexualmente maduros, varían notablemente su forma, tamaño y peso, dependiendo de los estados de reposo o actividad sexual y también del momento del ciclo estral en que se encuentre (Sandoval, 2000).

De forma general, el ovario de todas las hembras domésticas presenta un borde mesovárico (dorsal), un borde libre (ventral), así como una cara lateral y una medial. Con respecto a la posición de la extremidad tubárica (cranial) y la extremidad uterina (caudal), ocurre lo mismo y su denominación alude a su proximidad a la trompa o cuerno uterino, respectivamente. El término hilio del ovario se reserva al área circunscrita del borde mesovárico destinada a la entrada de los vasos y nervios; el aporte vascular del ovario se corresponde con las arterias ovárica y uterina (Gil y cols., 1997; Sandoval, 2000; Johnston y cols., 2001).

Desde el punto de vista estructural, el ovario se organiza en base a una densa masa cortical, llamada corteza del ovario o zona parenquimatosa, y de una médula del ovario o zona vascular en profundidad, mucho menos densa. Envolviendo a la primera se dispone una capa de tejido conectivo denso como túnica albugínea y, superpuesta a esta última, un epitelio de superficie de procedencia celómica (Gil y cols., 1997; Sandoval, 2000; Johnston y cols., 2001).

Los folículos ováricos son los componentes principales de la zona parenquimatosa. Los folículos alcanzan su máximo tamaño durante el proestro; junto con los grandes folículos preovulatorios, también se pueden observar un número importante de folículos de pequeño y mediano tamaño en la zona cortical. Tras la ovulación, los cuerpos lúteos alcanzan su mayor tamaño durante el diestro temprano, aproximadamente unos 20 días después del inicio del proestro (Sokolowski y cols., 1973; Gil y cols., 1997; Sandoval, 2000, Johnston y cols., 2001).



## 2.7. EL CICLO ESTRAL DE LA PERRA

### 2.7.1. Pubertad

La pubertad acontece a la edad de 7-12 meses, con un rango que oscila entre 6 y 18 meses. La pubertad tiende a presentarse antes en perras pequeñas que en perras grandes, ya que las primeras alcanzan antes su peso adulto. Del mismo modo, se presenta antes en perros semisalvajes o que vagan libremente que en las mascotas domésticas (Johnston y cols., 2001).

Aunque el primer celo en perra ya es fértil, no alcanza su máximo potencial reproductivo hasta el tercer o cuarto celo. En este primer celo de pubertad, se puede observar el denominado celo partido, consistente en una primera fase de inflamación y edema vulvar con descarga serosanguinolenta, pero donde no existe aceptación de la cubrición, seguida de una segunda fase durante 1 a 3 semanas donde desaparecen los síntomas externos y al final de la misma se produce la ovulación y la perra acepta el coito (Feldman y Nelson, 1987; Johnston y cols., 2001).

### 2.7.2. Ciclo Estral

Desde el punto de vista reproductivo, la perra se define como una hembra monoéstrica no estacional, con una duración del ciclo estral de al menos 5 meses (Johnston y cols., 2001) aunque otros autores establecen que el periodo interestro puede oscilar entre 4 a 13 meses, con una media de 7 meses (Concannon y cols., 1993, Johnston y cols., 2001). Asimismo, con independencia de que exista o no gestación, la perra manifiesta un largo período de relativa inactividad ovárica entre ciclos que se denomina anoestro. Por lo tanto, dado que el intervalo entre estros en la perra incluye esta larga fase de anoestro además de la fase luteínica, es frecuente utilizar el término metaestro en lugar de diestro para definir esta última fase (Jeffcoate, 2000).

A pesar de las posibles diferencias en el ciclo estral, el control del mismo se lleva a cabo por las mismas interacciones hormonales que en el resto de las hembras domésticas. Estas interacciones tienen lugar entre el hipotálamo y la hipófisis, que representan el eje principal, junto con el ovario, que supone la fuente de estrógenos y progesterona; finalmente, también se encuentran involucrados el tracto reproductivo tubular, las glándulas sexuales accesorias y los centros cerebrales del comportamiento (Jeffcoate, 2000; Johnston y cols., 2001).

El ciclo estral es una sucesión coordinada de cambios tanto a nivel ovárico como útero-vaginales, así como de modificaciones en el comportamiento de la hembra, cuya finalidad radica

en asegurar la producción y la fertilización de los gametos femeninos y el desarrollo intrauterino del feto. Se establece que, en general, las perras no gestantes muestran ciclos estrales continuos que constan de las siguientes fases proestro, estro, diestro y anoestro (Jeffcoate, 2000; Johnston y cols., 2001).

#### 2.7.2.1. Proestro

La duración del proestro puede oscilar entre 3 y 17 días, con un valor medio de 9 días. Existen diferentes signos clínicos que ponen de manifiesto el comienzo del proestro, como son el enrojecimiento y la dilatación de la vulva, así como la aparición de una secreción serosanguinolenta que se origina en el útero, considerándose este momento como el primer día de proestro. Además, el incremento de la concentración plasmática de estradiol generada por los folículos en desarrollo, suele provocar cambios en el comportamiento como son un incremento en la frecuencia de micción, mayor grado de inquietud y desobediencia y se produce un aumento de la atracción ejercida sobre los machos, aunque en esta fase la hembra no permite la monta (Allen, 1992; Jeffcoate, 2000; Johnston y cols., 2001; Kustritz, 2005a).

El desarrollo folicular provoca un incremento gradual en la concentración plasmática de estrógenos, que alcanza su valor máximo 2-3 días antes del estro, para luego experimentar una rápida caída durante el estro. El estradiol genera una serie de cambios en el tracto reproductivo, estimulando el crecimiento y la actividad del epitelio glandular, promoviendo además la vascularización y el edema generalizado de la mucosa. Esto último, provoca una fragilidad de los capilares presentes en la mucosa que, junto a las débiles uniones entre las células endoteliales, permiten el paso de sangre y células plasmáticas a la luz uterina, generando así la secreción vulvar serosanguinolenta (Concannon y cols., 1993; Johnston y cols., 2001).

En la evaluación citológica del proestro temprano, cuando las concentraciones de estrógenos son bajas, se detectan células epiteliales parabasales e intermedias. Es también común en esta fase la presencia de eritrocitos, así como algunos neutrófilos y bacterias. Conforme avanza el proestro y nos acercamos al estro, van desapareciendo las células parabasales y aumentando el número de células superficiales (Burke, 1986; Allen, 1992; Jeffcoate, 2000; Johnston y cols., 2001).

En esta fase acontece el desarrollo folicular, estimulado por las hormonas gonadotróficas que secreta el lóbulo anterior de la hipófisis bajo el efecto de la hormona hipotalámica liberadora

de gonadotropinas (GnRH). En aproximadamente un día, el pico en la concentración plasmática de estradiol termina generando un pico en la hormona luteinizante (LH), que aparece siempre de forma automática cuando se alcanza un cierto nivel de actividad folicular y de liberación de estradiol, ocurriendo una ovulación espontánea justo después del pico de LH. Por otro lado, la hormona foliculoestimulante (FSH) desempeña un papel fundamental en la maduración de los folículos y en su transformación a cuerpos lúteos tras la ovulación; asimismo, parece clara su implicación para que tenga lugar un incremento en la secreción de progesterona por parte de los folículos preovulatorios, fundamental en el desencadenamiento de la ovulación y el mantenimiento del estro. La concentración plasmática de progesterona es basal (<1-2 ng/mL) hasta el final del proestro, cuando comienza a incrementarse fruto de la luteinización de los folículos preovulatorios (Concannon y cols., 1977, 1993; Jeffcoate, 2000).

#### 2.7.2.2. Estro

La duración del estro en la especie canina es de 3-21 días, con una media de 8 días. Esta fase se caracteriza porque la hembra permite la monta por parte del macho y permanece inmóvil para ser fertilizada (Allen, 1992; Johnston y cols., 2001; Kustritz, 2005a).

En el estro, la vulva está flácida y la descarga vulvar a menudo es de color pajizo, aunque en muchas hembras la descarga vaginal puede continuar teñida de sangre a lo largo del estro (Kustritz, 2005a, b). Los estrógenos provocan una estimulación de la mucosa que se vuelve secretora para favorecer la supervivencia y el transporte de los gametos mediante una estimulación del músculo liso y de la actividad ciliar de los oviductos. Conforme avanza el ciclo y ocurre la luteinización de los folículos, el aumento en la concentración plasmática de progesterona provoca un cambio en la secreción mucosa que dificulta el transporte de los espermatozoides y su supervivencia y, en particular, la migración a través del cervix. Además, se disminuye la excitabilidad de la musculatura lisa, lo que probablemente enlentece el paso de los óvulos o los embriones por los oviductos, retrasándose su llegada al útero hasta que las condiciones sean más adecuadas. Por lo tanto, en la perra, la progesterona tiene un efecto facilitador de la supervivencia, el transporte y la fecundación de los gametos, pero todo ello puede requerir de un largo periodo de permanencia del estradiol (Concannon y cols., 1993; Jeffcoate, 2000; Johnston y cols., 2001).

El estro (receptividad sexual) empieza aproximadamente en el momento en que acontece el pico de LH, que tiene una duración de 24-48 horas y coincide con el descenso en la

concentración de estrógenos y un aumento en la de progesterona (Kustritz, 2005a). El aumento inicial de la concentración de progesterona plasmática implica que justo después ocurra la ovulación; por lo tanto, es un buen indicador del momento justo en que ocurre la ovulación, que es el momento culminante del ciclo estral, y que consiste en la rotura del folículo en la superficie del ovario (Allen, 1992; Sandoval, 2000; Simpson y cols., 2000; Kustritz, 2005a, b).

La ovulación, en forma de oocitos primarios, suele ser múltiple y acontece entre 30-48 horas tras el pico de LH, aunque algunos folículos pueden que no ovulen hasta 96 horas después. No obstante, el inicio del periodo fértil en la perra es aproximadamente 4 días después del pico de LH porque antes no es posible que se produzca la fecundación de los oocitos caninos, ya que se requieren 2-3 días adicionales tras la ovulación para que el ovocito madure a un ovocito secundario fertilizable (Allen, 1992; Concannon y cols., 1993; Jeffcoate, 2000; Johnston y cols., 2001; Kustritz, 2005a).

En el momento de la ovulación, la mayoría de las células del estrato granuloso y de la teca interna quedan retenidas dentro del folículo, cuyas paredes quedarán colapsadas. Precisamente, estas células son las encargadas de formar el cuerpo lúteo; por esta razón, las concentraciones de progesterona en el pico de LH son generalmente de 2-3 ng/mL, ya que este cuerpo lúteo es el que produce la progesterona indispensable para adaptar la mucosa, impregnar las paredes y activar el tono muscular de las trompas uterinas para captar el óvulo y, además, facilitar su fertilización por el espermatozoide. La mayor parte de los autores afirman que no existen diferencias apreciables en el cuerpo lúteo de la perra gestante y no gestante, mientras otros sí detectan estas diferencias, sobre todo en el porcentaje y número de células luteales (Jeffcoate, 2000; Johnston y cols., 2001; Kustritz, 2005a, b). Lo que parece unánime es que tras la ovulación, los niveles plasmáticos de progesterona se incrementan progresivamente conforme avanza el estro y llegamos al diestro (Hoffmann y cols., 2004).

Por otro lado, es necesario valorar que el semen canino tiene una supervivencia prolongada en el tracto genital femenino; si a esto le añadimos, el prolongado tiempo de ovulación y maduración de los oocitos (2-3 días) y de la supervivencia de los oocitos (1-3 días), se deduce que el período fértil de la perra puede oscilar entre 4 y 7 días después del pico de LH, obteniendo en estos días la mejor tasa de concepción y prolificidad. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que probablemente la fertilidad sea baja hacia el final de este periodo, siendo muchas

veces crucial inseminar en el momento óptimo, sobre todo si se utiliza semen crioconservado o un macho poco fértil (Allen, 1992; Farstad, 2000a; Kustritz, 2005a).

En el frotis vaginal se observa una mayoría de células superficiales, un escaso número de células intermedias y ausencia de parabasales (Allen, 1992; Johnston y cols., 2001). Pueden existir hematíes, pero su número es habitualmente bastante inferior al presente durante el proestro. El estro se suele definir cuando más del 90% de las células del frotis vaginal son superficiales (Olson y cols., 1984; Allen, 1992), si bien el inicio del estro citológico no siempre se correlaciona con el inicio de la receptividad sexual o el pico de LH.

### 2.7.2.3. Diestro

De manera general, se considera que ha empezado cuando la hembra rechaza la cubrición, circunstancia que acontece de 5-7 días tras la ovulación, alrededor de 8-10 días después del pico preovulatorio de LH. En esta fase, la vulva va adquiriendo progresivamente un tamaño más pequeño, se vuelve arrugada y con un buen tono. La descarga hemorrágica suele desaparecer, aunque en ocasiones puede existir una descarga vulvar mucoide. La duración del diestro es de 56-58 días desde la ovulación si la hembra ha quedado gestante y entre 60 y 100 días si la hembra no desarrolla una gestación (Allen, 1992; Concannon y cols., 1993; Jeffcoate, 2000; Kustritz, 2005a).

En el frotis vaginal se observan una serie de cambios como la aparición de leucocitos y el incremento de células parabasales y, en la endoscopia vaginal, se observa un adelgazamiento de la mucosa y los pliegues empiezan a mostrar un aspecto redondeado (Jeffcoate, 2000; Johnston y cols., 2001).

En cuanto a los cambios endocrinos, son difíciles de cuantificar salvo la concentración plasmática de progesterona. La concentración plasmática de progesterona sigue aumentando desde el inicio del diestro para alcanzar valores máximos unos 20-30 días después del pico de LH; a continuación, disminuye lentamente hasta el día 60, de tal forma que mantiene unos niveles entre 10-60 ng/mL durante unos 2 meses tras el estro (Allen, 1992; Jeffcoate, 2000). Hasta el día 60 del diestro no se observan diferencias importantes entre el animal gestante y no gestante, pero a partir de este momento las diferencias se manifiestan de manera evidente, cuando las concentraciones plasmáticas disminuyen drásticamente antes del final de la gestación, mientras que en una hembra no gestante, los niveles plasmáticos de progesterona

disminuyen de una manera gradual en los siguientes 30-60 días, debido a la ausencia de un mecanismo luteolítico (Simpson y cols., 2001; Hoffmann y cols., 2004).

En cuanto a la concentración plasmática de prolactina, es alta durante los días 30 a 60 tras el pico de LH, manteniéndose elevada entre los días 60 y 90, sobre todo en hembras lactantes (Allen, 1992; Concannon y cols., 1993; Johnston y cols., 2001).

#### 2.7.2.4. Anoestro

Es el periodo en el que no se observan signos externos de actividad ovárica (Allen, 1992). Cuando ocurren ciclos en donde hay gestación, esta fase se define como el periodo comprendido entre el parto y el proestro del ciclo consecutivo, por lo tanto, suele incluir la lactación (Concannon y cols., 1993; Jeffcoate, 2000). En hembras no grávidas, representa el periodo de transición entre el diestro de un ciclo y el proestro del consecutivo (Allen, 1992; Concannon y cols., 1993; Kustritz, 2005a, b) con una duración de 2-9 meses.

Durante esta fase, la vulva de la hembra se encuentra replegada, sin descarga vaginal manifiesta, la mucosa vaginal está pálida y con pliegues longitudinales. En este periodo, la hembra no atrae a los machos y no permite la monta (Johnston y cols., 2001). Al realizar una citología vaginal de una hembra en anoestro, observamos la presencia predominante de células parabasales e intermedias pequeñas, siendo frecuente la presencia de unos pocos leucocitos y de ningún eritrocito (Concannon y DiGregorio, 1986; Allen, 1992; Johnston y cols., 2001).

Desde el punto de vista endocrinológico, el anoestro se define como el periodo consecutivo al diestro, donde las concentraciones plasmáticas de progesterona alcanzan niveles basales, con valores por debajo de 1-1.5 ng/mL (Johnston y cols., 2001). Por otro lado, pueden detectarse concentraciones plasmáticas de estradiol relativamente altas, de 10 a 20 días antes de que la perra muestre ninguna manifestación de proestro, por lo que parece ser que existe un periodo de transición considerablemente largo después del anoestro (Olson y cols., 1984; Allen, 1992; Concannon y cols., 1993; Jeffcoate, 2000).

### 2.7.2.5. Modificaciones en la presentación de estros

Existen diferentes circunstancias que pueden originar la presentación de un intervalo interestro irregular. Entre estos, podemos distinguir:

- Celos divididos: cuando se manifiesta este tipo de celos, pueden aparecer intervalos interestros acortados. Se define el celo partido como la aparición de signos de proestro sin que ocurra ovulación, seguido de un corto periodo de anoestro (2-4 semanas) y luego se manifiesta un ciclo ovulatorio normal. Este tipo de celo suele ocurrir en hembras jóvenes durante el celo puberal y la hembra sólo es fértil durante el celo ovulatorio. Se pueden utilizar las citologías seriadas y la determinación de las concentraciones plasmáticas de progesterona para diagnosticar los celos partidos (Allen, 1992; Kustritz, 2005a).

- Celos silentes: esta alteración se caracteriza porque pueden aparecer intervalos interestro prolongados. En el celo silente, las perras presentan poca o ninguna edematización, ni descarga vulvar a pesar de tener un desarrollo folicular y una ovulación normales (Allen, 1992; Kustritz, 2005a). Las perras que padecen celos silentes, en general, atraen a los machos. Para realizar un correcto diagnóstico de los celos silentes y conseguir que estas hembras reproduzcan con normalidad, deben recogerse muestras para citología vaginal y ser evaluadas semanalmente, así como realizar una monitorización de las concentraciones séricas de progesterona cada 7-14 días, para determinar con precisión cuándo la perra comienza el ciclo y el momento óptimo para ser fertilizada (Kustritz, 2005a, b).

- Fallos en la ovulación: esta alteración suele tener como consecuencia un acortamiento del intervalo interestro, por la ausencia de la fase de metaestro (Allen, 1992; Watts y cols., 2001). El fallo en la ovulación se detecta monitorizando las concentraciones séricas de progesterona. En perras anovulatorias, la progesterona no aumenta a concentraciones normales del diestro (> 8-10 ng/mL). Se puede aplicar a la perra un tratamiento con gonadotropina coriónica humana (hCG) durante el siguiente estro para inducir la ovulación en ese ciclo (Watts y cols., 2001).

## 2.8. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DEL PERIODO DE MAXIMA FERTILIDAD EN LA PERRA

La causa más común de infertilidad en la perra es una monta a destiempo; por lo tanto, conociendo los estados del ciclo estral, los signos clínicos y la fisiología correspondiente, se puede optimizar la eficiencia de la monta o la inseminación artificial, y por lo tanto, mejorar la fertilidad (Allen, 1992; Kustritz, 2005a).

Para determinar el momento óptimo de fertilidad de la perra, deben emplearse conjuntamente los cambios en el comportamiento, las características de la descarga vulvar, la evaluación del edema vulvar, el examen citológico vaginal, la vaginoscopia y la progesterona sérica para cuantificar con exactitud el pico preovulatorio de LH (Johnston y cols., 2001; Watts y cols., 2001). No obstante, los procedimientos de los que se obtiene una información más objetiva del estado óptimo de fertilización son la citología vaginal, el examen de la mucosa vaginal y la determinación de los niveles plasmáticos de progesterona.

### 2.8.1. Citología vaginal

La citología vaginal consiste en obtener células de la mucosa vaginal, introduciendo un hisopo por la vagina preferiblemente utilizando un espéculo. Es importante evitar la fosa clitoriana ventral porque suele contener células queratinizadas que pueden confundirse con células epiteliales superficiales; por esta razón, aunque Allen (1992), describe el uso de lavados con suero fisiológico para obtener muestras de citología, no es un método muy estricto de toma de muestras. Para llegar al interior de la vagina, el hisopo humedecido con suero o agua se desliza en dirección craneodorsal, evitando la papila uretral en el suelo del vestíbulo, hasta llegar al arco isquiático, punto en el cual se dirige cranealmente, a este nivel el hisopo se rota en el interior vaginal unas pocas veces y luego se retira (Olson y cols., 1984; Allen, 1992; Johnston y cols., 2001).

Una vez tomada la muestra, el hisopo se desliza suavemente sobre un portaobjetos en dos o tres hileras; es muy importante no frotar el hisopo por el portaobjetos porque se altera la morfología de las células epiteliales. Tras secar el portaobjetos, la muestra se tiñe con una tinción diferencial (tricrómica, p.e. Wright-Giemsa modificada o Diff-Quik) o una tinción no diferencial (panóptico rápido). El tiempo requerido para teñir las células vaginales epiteliales es más largo que con los frotis sanguíneos; por ello, el portaobjetos debe colocarse en cada una de



las soluciones de tinción durante 10-15 segundos. Una vez seco, el portaobjetos se observa en un microscopio a 20-40x (Allen, 1992; Johnston y cols., 2001; Kustritz, 2005a).

El examen citológico vaginal se debería realizar cada 2 días desde que se inicia el sangrado y, una vez que las células epiteliales vaginales son cornificadas en más del 50%, se suele iniciar la medición de la progesterona (Johnston y cols., 2001; Edens y Heath, 2005).

El incremento de las concentraciones plasmáticas de estradiol en el proestro estimula la división celular en las capas basales del epitelio vaginal, observándose una hiperplasia de las células vaginales epiteliales; conforme va disminuyendo la concentración plasmática de estradiol se debilita el soporte endocrino de este nuevo epitelio estratificado, ya que el grosor del epitelio vaginal hace que las células más superficiales se sitúen lejos del aporte sanguíneo, con lo que aumenta el número de células queratinizadas no viables o muertas, desprendiéndose muchas de estas células superficiales. Conforme avanza el proestro, disminuye el número de células epiteliales nucleadas y aparecen un elevado número de eritrocitos, sobre todo en las fases iniciales y medias del proestro; asimismo, el número de neutrófilos es menor al final del proestro. Al final del proestro, más del 80% de las células epiteliales son células superficiales y la queratinización máxima ocurre al inicio del estro, cuando aumenta la concentración plasmática de progesterona. Durante el estro, en las muestras de citología vaginal se observa que más del 90% de las células presentes son superficiales cornificadas; además, hay un menor número de eritrocitos y no se aprecia la presencia de neutrófilos (Post, 1985; Johnston y cols., 2001).

Hacia el final del estro, normalmente entre 7-9 días tras el pico de LH, el frotis vaginal revela nuevos cambios como la aparición nuevamente de células epiteliales nucleadas y de un gran número de leucocitos, recibiendo el nombre de "frotis vaginal de metaestro". También al final del período de fecundación (7-9 días tras el pico de LH) acontece un periodo de transición en el que puede ocurrir un aumento de células nucleadas. En general, el periodo fértil y probablemente el estro, ya han pasado cuando se observan estos cambios. Normalmente, los cambios en la citología vaginal ocurren en un periodo de 24-36 horas tras el final del estro, pasando de presentar una cornificación completa de las células epiteliales a un 40-60% de células parabasales e intermedias; asimismo, también se observa las denominadas células del metaestro (células parabasales con un neutrófilo en el citoplasma) y células espumosas (células parabasales con vacuolas en el citoplasma). Finalmente en anoestro, el examen de la citología vaginal revela células epiteliales parabasales e intermedias, no hay eritrocitos y pueden

presentarse neutrófilos, aunque no deberían estar presentes en gran número en una hembra normal en anoestro (Allen, 1992; Johnston y cols., 2001; Edens y Heath, 2005).

La citología vaginal puede proporcionar información útil sobre el momento del ciclo sexual en que se encuentra la perra, pero la gran variabilidad en el momento de aparición de las principales características relacionadas con el momento de fertilidad máxima, puede hacer necesario utilizar otras técnicas confirmatorias (Johnston y cols., 2001; Edens y Heath, 2005).

### 2.8.2. Endoscopia vaginal

La vaginoscopia puede emplearse para determinar la caída en el estradiol sérico y estimar el día del pico de LH. La vaginoscopia se realiza empleando un endoscopio rígido, dirigiéndolo por la vagina tal como se indica para la recogida de muestras de citología vaginal. Los cambios vaginoscópicos son menos precisos que la medición de progesterona sérica para determinar el día óptimo de monta (Lindsay, 1983; Watts y cols., 2001; Kustritz, 2005a, b).

En la mucosa vaginal ocurre un marcado cambio de su aspecto cuando los folículos preovulatorios dejan de secretar estradiol para producir progesterona, observándose una reducción en la vascularización y el edema de la mucosa vaginal. Mediante endoscopia podemos observar que la mucosa vaginal al principio del proestro presenta un aspecto suave, redondeado y edematoso. Sin embargo, el edema disminuye progresivamente y la mucosa se vuelve pálida, incluso blanca, cerca del pico preovulatorio de LH. Además, conforme aumenta la concentración de progesterona, la mucosa se va volviendo cada vez más anfractuosa con un lumen más prominente, llegando un punto máximo a los 4-7 días después del pico de LH, por tanto, durante el periodo fértil. Durante el estro, es posible que la mucosa esté hiperémica pero a menudo es pálida. Una vez finalizado, el inicio del metaestro se caracteriza porque la mucosa vaginal es pálida y delgada, con pliegues cada vez más redondeados, siendo característico que los pliegues de la mucosa de la vagina anterior son irritables y tengan la capacidad de cerrarse rápidamente adquiriendo la forma de un rosetón (Allen, 1992; Johnston y cols., 2001; Watts y cols., 2001; Edens y Heath, 2005).

### 2.8.3. Determinación de concentraciones plasmáticas hormonales

Para la determinación de las concentraciones plasmáticas de progesterona existen kits de ensayo inmunoabsorbentes ligado a enzimas (ELISA), pero aunque son baratos y fáciles de realizar, no son tan precisos como el radioinmunoensayo (Edens y Heath, 2005).

Cuando se emplea la técnica ELISA, las concentraciones medidas se expresan como un rango, siendo un procedimiento más o menos adecuado si la inseminación se va a realizar utilizando semen fresco o refrigerado, pero no son lo suficientemente precisas para su uso con semen congelado (Manothaiudom y cols., 1995). Como inconveniente presenta que puede aparecer un falso descenso de la concentración de progesterona si la muestra está hemolizada o un aumento ficticio de la concentración de progesterona si los kits no se encuentran adecuadamente atemperados antes de su uso (Johnston y cols., 2001). Mediante la utilización del radioinmunoensayo, las determinaciones son más caras, pero se obtiene un valor absoluto de la concentración de progesterona; por lo tanto, son más precisos si se requiere conocer el día exacto de la ovulación, como en los casos en que se emplea semen congelado o un macho subfétil (Silva y cols., 1996; Rota y cols., 1999a; Watts y cols., 2001; Edens y Heath, 2005).

La progesterona es la única hormona útil para predecir el período fértil, ya que tanto la LH como el estradiol, aunque podrían ser igualmente útiles, tienen el inconveniente de que sería necesario tomar un elevado número de muestras y su determinación no suelen ser práctica. La medición de progesterona se realiza cada 48 horas hasta que la concentración sérica sea de 2-3 ng/mL y esta concentración coincide con el pico de LH (Renton y cols., 1992). Se recomienda realizar una nueva medición al día siguiente de que la progesterona haya alcanzado el valor de 2-3 ng/mL, para confirmar que sigue aumentando (Watts y cols., 2001; Johnston y cols., 2001; Daniels y Mundell, 2005).

El nivel de progesterona suele ser basal durante el final del anoestro y su concentración aumentará hasta niveles bajos, pero detectables (1 ng/mL), al inicio del proestro; durante la mayor parte del proestro, los niveles plasmáticos de progesterona son inferiores a 1-2 ng/mL. La progesterona plasmática empieza a aumentar en el momento del pico preovulatorio de LH, alcanzando 2-3 ng/mL alrededor de dos días después; en el día de la ovulación, la progesterona alcanzaría valores de 2-4 ng/mL; aunque otros autores describen concentraciones de 4-10 ng/mL en el momento de la ovulación (Rota y cols., 1999a; Simpson y cols., 2000; Johnston y cols., 2001; Daniels y Mundell, 2005). Hacia el cuarto día post-pico de LH, que indica el inicio del

periodo fértil, la progesterona circulante ya habrá alcanzado los 6-10 ng/ml o valores que oscilen entre 4-20 ng/mL. Durante todo el diestro, las concentraciones plasmáticas de progesterona permanecen elevadas. Finalmente, en anoestro, las concentraciones de progesterona se reducen justo antes del parto o de forma gradual, tras la regresión del cuerpo lúteo, en la hembra no gestante (Simpson y cols., 2000; Johnston y cols., 2001; Edens y Heath, 2005).

Existen algunas diferencias en las concentraciones de progesterona dependiendo de si se utilizan técnicas de radioinmunoensayo o inmunoensayo enzimático, obteniendo en este segundo caso valores más altos pero bien correlacionados. La mayoría de los trabajos publicados utilizan el radioinmunoensayo para la determinación de los niveles plasmáticos de progesterona (Concannon y cols., 1989; Silva y cols., 1996; Rota y cols., 1999a). Si se utiliza un inmunoensayo enzimático comercial, la concentración plasmática de progesterona durante el ciclo estral de la perra será prácticamente el doble, pero los cambios en cada fase del ciclo serán los mismos. Si se utilizan pruebas cualitativas no pueden obtenerse concentraciones absolutas de progesterona, pero pueden evaluarse los cambios en la concentración a medida que avanza el ciclo y utilizarse para corroborar otros signos clínicos (Manothaiudom y cols., 1995; Watts y cols., 2001).

Hay estudios que demuestran que el valor de progesterona obtenido en las muestras de plasma sanguíneo está influenciado por el anticoagulante utilizado. Así, el EDTA y la heparina actúan sobre el complemento, si bien dan como resultado un nivel de progesterona menor que el presente en el suero sanguíneo, ya que en éste se produce una activación espontánea del complemento durante la coagulación. Asimismo, los niveles de progesterona en sangre presentan una marcada influencia del fotoperiodo (Steinetz y cols., 1990), presentando valores ligeramente mayores durante las horas de luz decreciente, obteniéndose un valor similar el día de la ovulación independientemente del fotoperiodo y aumentando su valor durante las horas de luz creciente una vez, que ha tenido lugar la ovulación (Thuróczy y cols., 2003).

La LH sérica debe medirse cada 24 horas para asegurar que se identifica con exactitud el día del pico de LH. Se recomienda verificar los resultados positivos con la medición de la progesterona sérica y realizar otra medición de progesterona tras el pico de LH, para asegurar que se produce la ovulación y que genera y mantiene un tejido luteal normal. Si se realiza una inseminación, es mejor realizarla el día 5-6 tras el pico de LH; en el caso de que se siga un

procedimiento de dos inseminaciones, se deberían realizar los días 5 y 7 tras el pico de LH (Johnston y cols., 2001; Edens y Heath, 2005).

#### 2.8.4. Ecografía

El crecimiento folicular, la ovulación y el desarrollo de cuerpos lúteos pueden evaluarse por el uso de la ultrasonografía (Renton y cols., 1992; Hayer y cols., 1993). En la exploración ecográfica del ovario se utilizan básicamente transductores de alta frecuencia (7.5-10 Mhz), ya que proporcionan una información adecuada sobre los cambios más sutiles del tracto reproductivo (Wallace y cols., 1992). Aunque algunos autores proponen realizar ecografías seriadas dos veces al día para confirmar la ovulación, parece ser que la monitorización ecográfica diaria es más que suficiente para determinar el momento de la ovulación (Fontbonne, 2006).

El animal se coloca en decúbito dorsal de forma rutinaria y se rasura el pelo del abdomen ventral; sin embargo, para una exploración óptima son posibles muchas posiciones, incluyendo el decúbito lateral derecho o izquierdo e, incluso con el animal en estación. Para localizar el ovario se ecografía el polo caudal del riñón y el área adyacente en los planos sagital y transversal (Renton y cols., 1992; Wallace y cols., 1992).

Recientes estudios (Fontbonne, 2006) han confirmado que la ecografía era capaz de detectar con relativa precisión el día de la ovulación. Sin embargo, en menos de la mitad de las hembras, pudo detectarse claramente la desaparición de la cavidad folicular, siendo este hecho coincidente con estudios previos desarrollados en la especie canina (Hayer y cols., 1993).

#### 2.8.5. Otros procedimientos

Un estudio desarrollado en la especie canina testaba la utilización de una infusión de contraste radioopaco, demostrando que existe una interesante relación entre los niveles de estradiol y progesterona circulantes y la abertura cervical (Watts y cols., 2001). El cervix permanece cerrado hasta que la concentración plasmática de estradiol empieza a disminuir y la relación progesterona-estradiol se incrementa durante el período preovulatorio; posteriormente, el cervix permanece abierto hasta 6 días después del pico de LH, es decir, hasta 2 días antes de que se pueda detectar un verdadero metaestro por citología, siendo en este momento alta la concentración plasmática de progesterona y prácticamente indetectable el estradiol (Watts y cols., 2001).

## 2.9. TRATAMIENTOS DE INDUCCIÓN DEL CELO Y LA OVULACIÓN EN LA ESPECIE CANINA

La inducción del celo en la perra se encuentra indicada frente a numerosas circunstancias. La inducción del celo resulta clínicamente útil, conjuntamente con un correcto manejo reproductivo, cuando han existido fracasos en la ovulación, en hembras que presentan un anoestro demasiado prolongado, o ante situaciones de retraso evidente en la presentación de la pubertad. Asimismo, la inducción del celo se encuentra indicada en aquellas hembras reproductoras que precisen de un control para ser sometidas a un programa definido de fertilización, sea con monta natural o mediante inseminación artificial (Kutzler, 2005b).

### 2.9.1. Tratamientos a base de gonadotropinas

La pituitaria anterior secreta las gonadotropinas foliculoestimulante (FSH) y luteotrópica (LH). En el caso de la perra, la FSH estimula el desarrollo folicular inicial y su liberación está asociada con el proceso de ovulación. En cuanto a la LH, también actúa sobre el crecimiento folicular e induce la ovulación, siendo uno de los principales agentes luteotrópicos en la perra y junto con la prolactina, es la principal responsable del mantenimiento del cuerpo lúteo en la fase luteal tardía, tanto en la hembra gestante como en la no gestante. En el caso de la FSH, su concentración puede manifestar un aumento, lento pero progresivo, a lo largo del anoestro, mientras que la LH se mantiene en niveles basales salvo en los momentos cercanos al final del anoestro (Concannon y cols., 1993; England, 2000; Kutzler, 2005b).

La administración de las gonadotropinas puede presentar efectos adversos, siendo el principal, la posibilidad de inducir reacciones anafilácticas y formación de anticuerpos al inyectar estas preparaciones proteicas. En el caso de la perra, es poco probable que una única dosis de cualquier gonadotropina en anoestro provoque algún efecto adverso. Sin embargo, la administración de estos agentes a perras en celo puede generar una luteinización de los folículos e interferir en la ovulación. Por otro lado, la hiperestimulación del ovario como consecuencia de altas dosis o debidas a terapias repetidas pueden generar folículos no ovulatorios y un comportamiento de celo persistente. Asimismo, una elevación constante de la concentración plasmática de estrógenos puede causar efectos adversos típicos de una toxicidad estrogénica (Allen, 1992; England, 2000).

El protocolo habitualmente utilizado que incluye la aplicación de gonadotropinas, implica una terapia con dosis repetidas de eCG (Gonadotropina Coriónica equina) en perras en anoestro, con lo que se estimula el crecimiento folicular y la producción de estrógenos (Allen, 1992; Kutzler, 2005b). Estas terapias son más efectivas cuando se tratan a hembras al final del anoestro que al inicio; además debe tenerse especial cuidado con las combinaciones de eCG + hCG (Gonadotropina Coriónica humana) ya que puede originarse un hiperestrogenismo endógeno y causar una inhibición de la implantación, supresión de la médula ósea e incluso la muerte del animal. Por tanto, se ha sugerido el uso de bajas dosis de gonadotropinas para producir perfiles plasmáticos de estrógenos más fisiológicos. Frecuentemente, tras inducir el celo con gonadotropinas, puede generarse una concentración plasmática de progesterona relativamente baja y una fase luteal corta (England, 2000).

Un posible tratamiento es la administración de eCG, a dosis de 20 UI/kg, durante un periodo de 5 días; a partir de este quinto día se puede optar por esperar que acontezca una ovulación espontánea debida a la oleada endógena de LH, o inducir la ovulación utilizando hCG en el 5º día de tratamiento, utilizando una dosis de 25 UI/kg o bien una dosis única de 500 UI/animal (Arnold y cols., 1989; Allen, 1992; Weilenmann y cols., 1993; England, 2000). Los signos del celo se presentan entre un 90 y un 100% de las perras, y la ovulación acontece en un 90% de las hembras. Asimismo, la fertilidad observada con estos tratamientos alcanza valores superiores al 50% (Arnold y cols., 1989; Weilenmann y cols., 1993; England, 2000).

Otro protocolo ampliamente utilizado consiste en una combinación a base de eCG (20-44 UI/kg) durante 9-10 días seguidos, junto con la administración de hCG el último día del tratamiento, o bien el primer día del proestro. Los signos del celo se presentan entre un 50 y 100% de las perras, mientras que el porcentaje de gestaciones se sitúa entre un 60 y un 100% de las hembras tratadas (Archbald y cols., 1980; Chaffaux y cols., 1984). No obstante, otros autores comparten la idea que una aplicación de eCG durante largo tiempo puede comprometer la fertilidad futura a consecuencia del hiperestrogenismo; estos niveles elevados de estrógenos que se prolongan en el tiempo pueden inducir efectos colaterales indeseables (England, 2000).

### 2.9.2. Tratamientos mediante la utilización de antagonistas de la prolactina

La prolactina es el principal factor luteotrópico de la fase luteal tanto en hembras preñadas como no preñadas. En hembras no grávidas, se ha comprobado que con la administración de antagonistas de la prolactina, se consigue un descenso rápido de la concentración de prolactina y, como consecuencia, se produce un descenso en las concentraciones plasmáticas de progesterona (England, 2000). Con una supresión prolongada de la prolactina se termina provocando el final de la fase luteal y la perra entra en anoestro; por el contrario, si se administran antagonistas de la prolactina durante el anoestro se consigue un acortamiento del mismo y por lo tanto, la hembra entra en estro más rápidamente que de forma natural (Arbeiter y cols., 1988; England, 2000; Kutzler, 2005b). El mecanismo por el cual los antagonistas de la prolactina inducen el estro es desconocido; sin embargo, hay estudios que afirman que el desarrollo folicular y la inducción del estro mediante el uso de bromocriptina está asociado a un aumento de la concentración plasmática de FSH sin que se produzca simultáneamente un aumento en la concentración plasmática de LH (Kooistra y cols., 1999; Simpson y cols., 2000; Beijerink y cols., 2003).

La bromocriptina y la cabergolina son derivados del ergot que inhiben la liberación de prolactina mediante estimulación directa sobre los receptores dopaminérgicos de las células liberadoras de prolactina en la glándula pituitaria anterior. La cabergolina muestra una mayor especificidad, presentando pocos efectos colaterales atribuibles a la estimulación dopaminérgica del sistema nervioso central (England, 2000).

La administración de bromocriptina tiene asociados la presentación de algunos efectos secundarios, tales como náuseas, vómitos, letargia y constipación ocasional. Estos efectos pueden minimizarse utilizando la dosis mínima efectiva y mezclando el fármaco con comida. La disminución del intervalo interestro es dosis dependiente; sin embargo, es posible inducir el estro utilizando pequeñas dosis de bromocriptina sin que disminuya la concentración plasmática de prolactina (Allen, 1992; England, 2000; Zoldag y cols., 2001; Beijerink y cols., 2003; Kutzler, 2005b). La cabergolina no provoca estos efectos adversos (Verstegen y cols., 1999; England, 2000).

Cuando se utiliza la bromocriptina, se describen protocolos que administran entre 10 a 50 µg/kg/día, vía oral, hasta el inicio del proestro pudiendo presentarse emesis como principal efecto adverso. El proestro, en general, se presenta como media tras 17-47 días de tratamiento,



en función de las dosis empleadas por los diferentes autores (Haafte y cols., 1989; Allen, 1992; Concannon, 1993; Zoldag y cols., 2001). El porcentaje de hembras presentando proestro oscila entre un 80 y un 100%, describiéndose hasta un 83% de gestaciones en las hembras sincronizadas (Haafte y cols., 1989; Concannon, 1993; Zoldag y cols., 2001).

En el caso de la cabergolina, la mayoría de los autores coinciden en administrarla vía oral a una dosis de 5 µg/kg/día hasta que se inicie el proestro o bien prolongando su administración durante los primeros días del proestro inducido (Verstegen y cols., 1999; Rota y cols., 2003). Verstegen y cols. (1999) describen que son suficientes 20 días de tratamiento para aquellas hembras que se encuentran en anoestro temprano, mientras que sólo con 6 días de tratamiento ya manifiestan signos de celo aquellas hembras que se encuentran al final del anoestro. No obstante, otros estudios confirman la presentación de signos evidentes de proestro a los 30 días tras el inicio del tratamiento, con presentación de manifestaciones estrales entre un 80 y un 100% de las hembras tratadas (Verstegen y cols., 1999; Rota y cols., 2003). El porcentaje de gestaciones se sitúa entre un 60 y un 100% de las hembras sincronizadas (Verstegen y cols., 1999; Rota y cols., 2003).

Tras la administración de los tratamientos con antagonistas de la prolactina, el tiempo de aparición del estro es variable y parece que depende del estado de anoestro que presente el animal: las hembras a final de anoestro responden más rápidamente que las que se encuentran al inicio, y éstas más temprano que cuando se administra en fase luteal; a pesar de esto, existe cierta unanimidad en que no se debe iniciar el tratamiento hasta que hallan transcurrido al menos 90-120 días desde el último celo, para permitir una involución uterina normal, así como la desaparición del cuerpo lúteo (Verstegen y cols., 1999; England, 2000; Kustritz, 2005b).

### **2.9.3. Tratamientos a base de la administración de GnRH o agonistas de GnRH**

La administración pulsátil de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) a dosis entre 0.01-0.4 µg/kg a intervalos de 90 minutos, parece suficiente para incrementar los niveles de LH de manera similar a lo generado por los pulsos endógenos que normalmente acontecen hacia el final del proestro (Concannon, 1993). No obstante, los protocolos de inducción mediante la utilización de GnRH no parecen tener una aplicación clínica clara, debido al coste del tratamiento y a la necesaria hospitalización de la hembra durante el tiempo que fuese preciso la continua infusión intravenosa (Kutzler, 2005b). Se describe un 100% de hembras mostrando signos de proestro, un 87.5% mostrando ovulaciones y un porcentaje similar de gestación cuando a

hembras en anoestro, se les administraba dosis de 0.09-0.14 µg/kg de GnRH, por vía endovenosa, cada 90 minutos, durante un periodo de 11 a 13 días.

La administración de agonistas de GnRH (buserelin, gonadorelin, deslorelin) ha mostrado su eficacia para inducir la ovulación en diferentes especies animales, pero no se han realizado muchos estudios que confirmen su utilización en la especie canina. Rota y cols. (2003) llevaron a cabo un estudio donde se administraba buserelin (acetato) a dosis de 1.5 µg/kg durante 11 días y disminuyendo a 0.75 µg/kg en los tres días posteriores, obteniendo sólo un 30% de hembras que mostraban signos de proestro, en un intervalo medio de 18.6 días tras el inicio del tratamiento, y una tasa de gestación del 20% de las hembras tratadas. La administración de deslorelin a modo de implantes en la mucosa subvulvar, a dosis total de 2.1 mg/implante, se ha traducido en la presentación de proestros en la totalidad de los animales tratados, con una tasa de gestación que oscilaba entre un 40-67% (Kutzler, 2005b).

Finalmente, se puede aplicar tratamientos para provocar una inducción de la ovulación. Se ha observado que cuando las perras tienen proestros o estros prolongados, la administración de gonadotropinas a dosis de 25 UI/kg de hCG, cuando se observa en la citología vaginal más de un 90% de células superficiales enucleadas o se detecta un leve aumento en las concentraciones plasmáticas de progesterona, puede acelerar la ovulación. Sin embargo, si se administra hCG de forma prematura puede provocar una luteinización folicular y fallo en la ovulación (Allen, 1992; England, 2000). De forma similar, si se administra una dosis intravenosa única de 0.01 µg/kg de GnRH puede acelerarse la ovulación de las perras en estro (England, 2000).

#### 2.9.4. Tratamientos a base de estrógenos

Los estrógenos son producidos por los folículos ováricos en la perra y son los responsables del desarrollo de los caracteres sexuales de la hembra. Estas hormonas son necesarias para la secreción y funcionamiento normal de los cuernos uterinos. Cuando ocurren cambios en la concentración de estrógenos, se regula el aumento de gonadotropinas que estimulan la ovulación. Altas dosis de estrógenos exógenos causan un *feed-back* negativo en el eje hipotálamo-pituitario suprimiendo la secreción de gonadotropinas; sin embargo, a bajas dosis provocan un aumento en la liberación de FSH (England, 2000).

Se ha demostrado que, en función de la dosis, los estrógenos generan una aplasia de la médula ósea que provoca una anemia de carácter grave y posiblemente fatal, además de trombocitopenia. Existe una variación individual considerable frente a la toxicidad de la dosis aplicada; por esta razón, se suelen aplicar tratamientos largos a dosis bajas para reducir la toxicidad; asimismo, se recomienda la administración oral de los fármacos para suspender inmediatamente el tratamiento si se observan efectos adversos. De la misma forma, los estrógenos provocan un efecto estimulante de la progesterona sobre el útero y además generan una relajación cervical, permitiendo la entrada de bacterias vaginales al útero y, por tanto, indirectamente favorecen la aparición de hiperplasia quística endometrial y piómetra. Finalmente, el uso prolongado de los estrógenos puede producir una alopecia simétrica bilateral no prurítica e hiperpigmentación en la piel (Allen, 1992; England, 2000).

Para inducir el estro, se pueden administrar dosis bajas de estrógenos (0.3 mg/kg/día durante 10 días) con lo que se permite que la FSH estimule el crecimiento de receptores de LH sobre las células de granulosa y aumenta la falta de respuesta a las concentraciones basales de LH. El resultado es el crecimiento folicular y la producción de estrógenos a medida que los folículos maduran, las paredes se luteinizan y se produce progesterona. Sin embargo, en la mayoría de las ocasiones los estrógenos sólo van a conseguir que se desarrollen las manifestaciones estrales, pero no se suele acompañar de ovulación (England, 2000).

## 2.10. GESTACIÓN Y SU DIAGNÓSTICO EN LA PERRA

La duración de la gestación en la perra varía considerablemente y depende de qué parámetro fisiológico o de comportamiento fue utilizado como día 0 (Johnston y cols., 2001). De esta forma, si la duración de la gestación se calculase con respecto al pico preovulatorio de LH, su valor medio sería de 63-65 días (Eilts y cols., 2005) con una variabilidad muy escasa, mientras que si se calcula desde el primer día en que la perra rehúsa el apareamiento (día 1 del diestro), la duración de la gestación es casi constante y dura un promedio de 57 días. No obstante, si la duración de la gestación se define como el periodo que transcurre desde el día de la primera monta hasta el día del nacimiento, muestra una amplia variabilidad, desde 57 a 72 días (Concannon y cols., 1983, 1989; Allen, 1992; Kustritz, 2005c).

Hay autores que afirman que la duración de la gestación depende tanto de la raza como del número de gestaciones que haya tenido la hembra (Tibary y Memon, 2005), si bien parece evidente que a partir de la tercera gestación la duración de la misma se incrementa (Kustritz, 2005c). Asimismo, de manera general, las hembras gestantes de camadas de 5 o más cachorros presentan tiempos de gestación menores que aquellas perras que gestan menos de 4 cachorros (Eilts y cols., 2005). Se podría concluir que existe una correlación positiva entre la duración de la gestación y el número de la preñez, y una correlación negativa entre el tamaño de la camada y la duración de la preñez (Johnston y cols., 2001; Tibary y Memon., 2005).

### 2.10.1. Endocrinología de la gestación

El mantenimiento de la gestación en la perra depende de la secreción de progesterona a lo largo de la misma. Aunque se ha constatado que la placenta aporta progesterona, es ampliamente aceptado que los ovarios representan la principal fuente de progesterona para el mantenimiento de la gestación en la perra (Kiso y cols., 1984; Johnston y cols., 2001).

Las concentraciones plasmáticas de progesterona son similares entre una perra gestante y una perra no gestante en diestro (Allen, 1992). Por tanto, los niveles más elevados de progesterona se alcanzan entre 15-20 días tras el pico preovulatorio de LH, se mantienen elevados durante varias semanas y, finalmente, comienzan un suave descenso, hasta alcanzar niveles basales (< 1-2 ng/mL) entre 24 a 48 horas antes del parto (Concannon y cols., 1977; Johnston y cols., 2001). Los niveles máximos de progesterona durante la gestación o el diestro son variables, oscilando desde 10 a 60 ng/mL (Concannon y cols., 1989).

Las concentraciones plasmáticas de prolactina se incrementan en la segunda mitad de la gestación, de manera coincidente con la disminución en los niveles circulantes de progesterona en sangre (Fernandes y cols., 1987; Allen, 1992). En un estudio desarrollado en Beagles, los niveles de prolactina pasaron de valores de 40 ng/mL en la última semana de gestación hasta casi triplicar su nivel en el periodo inmediatamente anterior al parto (Concannon y cols., 1989). En la perra, parece evidente que la prolactina desempeña una función luteotrópica, en mayor nivel que la hormona luteinizante (Johnston y cols., 2001).

La relaxina es una hormona que se detecta en el plasma de hembras gestantes y lactantes, pero no así en hembras no gestantes, independientemente de la fase del ciclo en que se encuentren (Allen, 1992). Alcanzan su máximo valor en las 2-3 semanas finales de la gestación, declinan ligeramente hasta el momento del parto y luego mantienen unos niveles ligeramente elevados durante todo el periodo de lactación (Johnston y cols., 2001).

## 2.10.2. Diagnóstico de gestación

### *I. Palpación abdominal*

Aunque se puede realizar antes, la palpación transabdominal del útero revela la existencia de vesículas embrionarias a partir de los 21-22 días tras la cubrición. Con esta edad, las vesículas tienen alrededor de 1 cm de diámetro y se localizan hacia la mitad caudal del abdomen. Conforme avanza la gestación, las vesículas se vuelven más grandes y más ventrales, siendo el día 28 tras la cópula el momento óptimo para el diagnóstico de gestación por palpación, puesto que las vesículas se palpan con mayor facilidad. A partir del día 35, las vesículas no están separadas sino que confluyen, siendo muy difícil o imposible el diagnóstico de gestación a partir de esta fecha (Allen y Mederith, 1981; Concannon y cols., 1989; Allen, 1992; Kustritz, 2005c).

Este método de diagnóstico tiene sus limitaciones en perras obesas, nerviosas o con un bajo número de vesículas embrionarias; asimismo, esta técnica no determina la vitalidad fetal. Mediante palpación, la exactitud de la técnica para diagnosticar gestación se viene a situar en torno al 88% (Tibary y Memon, 2005; Kustritz, 2005c).

### *II. Diagnóstico radiológico*

La osificación comienza el día 28 de gestación, pero no es fácilmente detectable hasta el día 42-44 de gestación y es prominente a partir del día 50, pudiendo a partir de este momento, determinar con relativa exactitud el número de cachorros (Miles, 1995).

La radiografía es una técnica que determina con absoluta seguridad la gestación en el último tercio de la gestación (Toal y cols., 1986; Allen, 1992), si bien presenta la limitación de ser un diagnóstico no demasiado precoz y no determina concluyentemente la vitalidad fetal (Kustritz, 2005c).

### *III. Ultrasonografía*

La ecografía es un método seguro y eficaz para diagnosticar la gestación, que no representa riesgos ni para el animal ni para el técnico veterinario (Kustritz, 2005c). Se describen tres modalidades de diagnóstico por ultrasonidos en la especie canina: modo A, modo B y Doppler, pero debido a la facilidad de su utilización y a la completa información que nos aporta, la mayoría de los autores utilizan la ecografía en modo B, con sondas entre 5 a 7.5 MHz (England y Allen, 1990; Allen, 1992; Yeager y cols., 1992; Miles, 1995).

La ecografía en modo B o a tiempo real, permite identificar no sólo a las hembras gestantes, sino también define la viabilidad fetal, el nº fetos, así como la conformación placentaria (Allen, 1992; Tibary y Memon, 2005). Aunque las vesículas embrionarias se pueden visualizar con más precocidad, los primeros signos positivos de gestación se observan entre los días 21 a 23, con la detección de vesículas de 1 cm de diámetro muy cerca de la vejiga de la orina. Sin embargo, la actividad cardíaca puede verse bien por primera vez entre los días 25-28 de gestación, y el movimiento fetal suele ser identificado tras el día 30 (England y cols., 1990). El momento ideal para estimar el nº de fetos es sobre el día 28 postcubrición, si bien siempre se tiende a identificar un menor número de fetos, especialmente en grandes camadas (Toal y cols., 1986; England y cols., 1990).

Mediante la utilización de la ecografía en modo B, la mayoría de los estudios muestran una eficacia 94-98% para diagnosticar hembras gestantes alrededor de los 24-25 días, alcanzado casi el 100%, si la ecografía se realiza del día 28 en adelante (Concannon y cols., 1989; Yaeger y cols., 1992).

### *IV. Determinación de perfiles hormonales*

La progesterona alcanza su valor máximo sobre el día 30 de gestación y a partir de entonces comienza a disminuir gradualmente. El descenso de la progesterona es menos pronunciado en perras gestantes que en no gestantes, pero como la diferencia es tan sutil, no se considera a la

progesterona como una prueba útil de diagnóstico de gestación, ya que todas las perras tienen una fase luteal pronunciada tras el estro (England, 2000; Tibary y Memon, 2005).

Con respecto a los estrógenos, se ha valorado la posibilidad de medir sulfato de estrona en orina unas 3 semanas después de la cubrición, que es el momento que coincide con la nidación, pero no se ha evaluado de forma estricta (Johnston y cols., 2001). En cuanto al estradiol plasmático, también se detecta muy bien en plasma en fases más avanzadas de la gestación, pero presenta el inconveniente de que su concentración no es mucho mayor que durante el diestro, por lo cual no resulta una determinación útil (Johnston y cols., 2001).

Existe un test de relaxina disponible para el diagnóstico en perras después del día 25 de gestación aproximadamente. La relaxina es la única hormona que se conoce específica de la gestación de carnívoros y es producida principalmente por la unidad fetoplacental. En el caso de la perra, ya se detecta desde la tercera semana de gestación, obteniéndose el pico de concentración plasmática en los días 40-50 de gestación con unos valores de 4-5 ng/mL. Los niveles de relaxina disminuyen lentamente tras el parto, pero se mantienen niveles detectables en sangre durante las 4 a 9 semanas postparto (England, 2000; Johnston y cols., 2001; Tibary y Memon, 2005).

En cuanto a la prolactina, las concentraciones de esta hormona empiezan a aumentar significativamente en la perra gestante entre 25-30 días tras el pico de LH, llegando a concentraciones de hasta 60 ng/mL cerca del parto. La prolactina no puede emplearse para la detección de la gestación antes del día 35 tras el pico de LH (England, 2000; Johnston y cols., 2001; Tibary y Memon, 2005).

Finalmente, existe la posibilidad de valorar la presencia de algunas proteínas de fase aguda, como el fibrinógeno o la proteína C-reactiva, que aumentan en hembras gestantes aproximadamente a los 30-40 días de gestación, mientras que se mantiene en niveles normales cuando se valora en hembras no gestantes a un tiempo equivalente. No obstante, otros procesos inflamatorios que puede presentar el útero, como por ejemplo la piómetra, originan también un incremento de estas proteínas de fase aguda, pudiendo dar lugar a un resultado falso positivo (England, 2000; Johnston y cols., 2001; Schäfer-Somi y cols., 2005; Tibary y Memon, 2005)

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS



### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. VALORACION DE LA CALIDAD SEMINAL IN VITRO

##### 3.1.1. Animales

En esta primera fase experimental, se utilizaron un total de 8 machos de la especie canina, ubicados en el Albergue Insular de Animales de Gran Canaria, cuyas edades oscilaban entre los 2-5 años y un peso de  $24.0 \pm 3.0$  kg (media  $\pm$  ESM). La tabla 3.1 especifica la edad, peso y raza de cada uno de los ejemplares.

La selección de estos animales se realizó entre un total de 40 machos sexualmente activos y sin afecciones del tracto reproductivo, descartando aquellos ejemplares que se inhibiesen o no colaborasen en la extracción seminal, o bien que su calidad seminal fuera deficiente. Asimismo, se pretendía que los animales seleccionados presentasen un tamaño y peso medios, de tal forma que no fuese necesario realizar un elevado número de recogidas por perro, para obtener el número de dosis seminales precisas para el desarrollo de la experiencia.

Dos meses antes del comienzo de la experiencia, todos los ejemplares seleccionados fueron entrenados semanalmente, para la realización de recogida seminal mediante estimulación manual.

Tabla 3.1. Raza, edad y peso de cada uno de los machos donantes

	Identificación de los animales							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Raza	Boxer	Mestizo	Mestizo	Spitz	Rottweiler	Mestizo	Mestizo	Labrador
Edad (años)	2	3	4	4	3	2	2	5
Peso (Kg)	32	18	14	21	37	25	14	31

##### 3.1.2. Estado sanitario, alimentación y alojamiento

Durante todo el periodo de recogidas seminales se comprobaba que los animales no presentasen ningún tipo de proceso patológico, tal como enfermedades sistémicas, infecto-contagiosas o parasitarias, que pudiesen provocar una disminución de la calidad del semen o que afectasen negativamente al estado de salud del animal. Los perros se encontraban vacunados contra moquillo,

leptospirosis y hepatitis (Canigen®, Virbac), parvovirus (Parvigen®, Virbac) y rabia (Rabdomun®, Schering-Plough). Asimismo, los animales eran desparasitados periódicamente tanto de ectoparásitos (Front-Line®, Merial), como de endoparásitos, mediante la administración de ivermectina y pirantel (Cardotek-30 Plus®, Merial), oxicendazol y niclosamida (Vitaminthe®, Virbac) y praziquantel (Zipyran®, Calier).

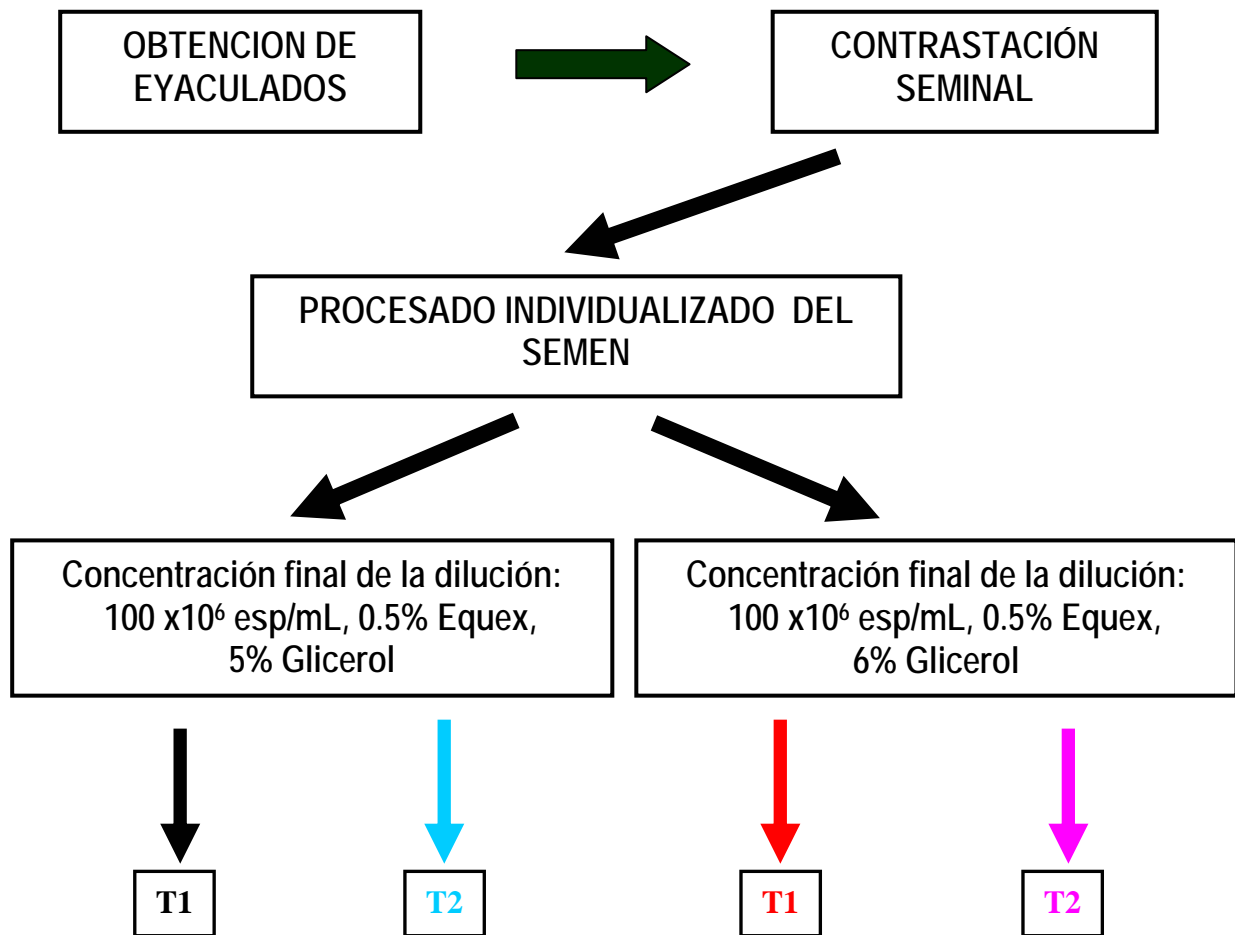
Los animales se encontraban alojados en dos corrales de unos 360 metros cuadrados, provistos de una zona cubierta y un patio de ejercicio al aire libre, con una superficie útil por perro de unos 20 metros cuadrados. La alimentación consistía aproximadamente en 0.5 kg/día/animal de pienso de mantenimiento (HPR15, Hill's maintenance) y agua *ad libitum*.

### **3.1.3. Planificación del trabajo experimental**

La Figura 3.1 muestra el diseño del trabajo experimental describiendo los diferentes procedimientos a los que fue sometido el semen, que incluía el procesado individualizado de cada eyaculado, la dilución del semen mediante dos diluyentes con diferente concentración de glicerol (5 y 6%, concentración final), así como la congelación y conservación del semen mediante el uso de ultracongeladores de  $-152\text{ }^{\circ}\text{C}$  frente al método tradicional con nitrógeno líquido. Del mismo modo, se expresan los diferentes parámetros que se valoraron tras la congelación-descongelación de las muestras (motilidad, vitalidad, morfoanomalías y acrosomías), así como los diferentes periodos de criopreservación evaluados (1 día, 1 mes, 3 meses, 6 meses y 1 año).

El trabajo experimental se desarrolló de acuerdo con la legislación española y europea relativa a la investigación y experimentación animal.

Figura 3.1. Planificación del trabajo experimental a lo largo de la experiencia



EVALUACION POST-DESCONGELACIÓN

DIAS	1	30	90	180	365
	Mt	Mt	Mt	Mt	Mt
	Vt	Vt	Vt	Vt	Vt
	Ma	Ma	Ma	Ma	Ma
	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac

T1: Congelación y conservación en ultracongelador de  $-152\text{ }^{\circ}\text{C}$ . T2: Congelación y conservación en nitrógeno líquido.

Mt: Motilidad espermática. Vt: Vitalidad espermática. Ma: Morfoanomalías. Ac: Acrosomías.

### 3.1.4. Recogida seminal

Previamente al comienzo de cada una de las recogidas seminales, se realizaba una inspección minuciosa de los genitales externos del macho para descartar posibles patologías. Posteriormente, se efectuaba una limpieza del pene y prepucio con suero fisiológico atemperado, con objeto de eliminar los posibles restos de orina, exudados, pelos o suciedad que pudiesen generar una disminución de la calidad del eyaculado obtenido.

La obtención de los eyaculados se realizaba por estimulación manual y siempre era llevada a cabo por el mismo operador. La estimulación manual se iniciaba sobre el bulbo del pene, observando como aumentaba progresivamente de tamaño; una vez se comprobaba que alcanzaba un 30-40% de su volumen sin que el donante se inhibiese, se exteriorizaba el bulbo fuera del prepucio. A continuación se realizaba la rotación caudal de 180° del pene, intentando de esta forma simular al máximo la disposición anatómica que adquiere el pene cuando se produce una monta natural entre un macho y una hembra de la especie canina. En este punto, se continuaba estimulando el bulbo hasta que alcanzaba un tamaño adecuado para que se iniciase la eyaculación y, a partir de este momento, se comenzaban a realizar una serie de pequeñas contracciones sobre el bulbo (similares a las que ocurren de forma fisiológica en la vagina de la hembra), para favorecer el inicio de la eyaculación.

Al comenzar la eyaculación, se intentaba recoger de forma independiente las tres fracciones del eyaculado, puesto que para el posterior procesado del semen sólo se precisaba de la segunda fracción. Esta recogida se llevaba a cabo en tubos de recolección graduados y atemperados a 37 °C; de esta forma, se obtenían por separado y en su totalidad la 1ª y 2ª fracción del eyaculado, mientras que de la 3ª fracción, habitualmente más voluminosa, sólo se recogía una parte de la misma. Todos los tubos de recogida se colocaban en un baño María a 37 °C para mantener las muestras atemperadas y evitar que sufriesen algún deterioro en su calidad, que pudiese interferir negativamente en la posterior técnica de diluyo-conservación.

Finalmente, una vez completada la recogida, se comprobaba la detumescencia del pene y su correcta retracción al interior del prepucio, para evitar que ocurriesen laceraciones, estrangulaciones o desecaciones excesivas que pudiesen provocar una afectación posterior, así como disminuir la libido del animal para futuras extracciones.

La frecuencia de recogida fue semanal, hasta obtener el número suficiente de dosis seminales por donante. En todas las recogidas, siempre se intentaba obtener un primer y un segundo eyaculado, descartándose las muestras que presentan una calidad seminal insuficiente. Las recogidas seminales se efectuaron durante un periodo de tres meses (diciembre de 2003-marzo de 2004) y el número de recogidas osciló entre 3 y 6 por donante.

### 3.1.5. Contrastación seminal

Una vez finalizada la recogida, se valoraron una serie de características macro y microscópicas de cada uno de los eyaculados, con el objeto de determinar la calidad seminal y valorar la posible influencia que ésta pudiese tener sobre los posteriores procedimientos de diluyococonservación y congelación del semen.

#### 3.1.5.1. Pruebas macroscópicas

##### *I. Volumen eyaculado*

El volumen del eyaculado se determinó por observación directa de los tubos colectores graduados utilizados para la recogida. Estos tubos de recogida se colocaron, inmediatamente tras la obtención del eyaculado, en un baño María a 37° C, manteniéndose atemperados durante todo el proceso de contrastación seminal.

##### *II. Color del eyaculado*

El color del eyaculado también se valoraba directamente en el tubo colector de recogida, por observación directa del mismo. Esta valoración se realizaba siempre por los mismos observadores y nunca pasados más de 5 minutos desde la recogida.

#### 3.1.5.2. Pruebas microscópicas

##### *I. Motilidad individual progresiva*

Para evaluar el porcentaje de espermatozoides móviles se utilizaba una gota de semen fresco sin diluir. Cuando la concentración espermática era muy elevada, se diluía la muestra en solución salina (0.9% NaCl) a 37 °C, hasta que se alcanzaba una concentración de 100-200 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL. En cualquier caso, se tomaba una gota que se colocaba entre un portaobjetos y un cubreobjetos atemperados a 37 °C mediante la utilización de una placa calefactora (HT-200; Minitüb Gmb, Alemania), generando así una fina película que permitía determinar el número de células móviles presentes en la muestra, e incluso realizar una valoración sobre el tipo de movimiento espermático. El semen se observaba utilizando un microscopio Olympus BH2-NIC-2 de

interferencia diferencial o Nomarski entre 100 y 200 aumentos, valorándose en cada muestra un mínimo de 10 campos localizados en la zona central del cubreobjetos.

La valoración del movimiento se realizaba sobre aquellos espermatozoides que mostraban un movimiento progresivo. Sólo se consideraban los espermatozoides con movimientos de avance y no aquellos que presentasen movimientos rotatorios, movimientos circulares o movimientos vibratorios (Nöthling y Shuttleworth, 2005).

Al ser un tipo de valoración subjetiva, la realizaron siempre los mismos observadores durante toda la experiencia. Los evaluadores nunca conocían la procedencia de la muestra seminal y cada muestra era valorada independiente y separadamente por cada uno de los observadores. El procedimiento habitual consistía en que los evaluadores determinaban de manera independiente cada muestra seminal, y posteriormente se hallaba el valor medio de esas observaciones; la diferencia entre los valores obtenidos por los dos observadores no podía ser superior a un 10%. En aquellas situaciones donde entre ambos técnicos existiera una discrepancia superior a un 10% en el valor otorgado a una determinada muestra, se procedía a repetir la evaluación. El valor de motilidad de cada muestra era el resultado de hallar la media de las valoraciones de cada uno de los evaluadores, aproximándola al 5% más cercano.

Para este estudio, se seleccionaron únicamente las muestras que presentaban, como mínimo, una motilidad individual progresiva superior al 80%.

## *II. Concentración espermática*

La determinación de la concentración seminal se realizaba diluyendo previamente el semen a razón de 1:41 en una solución salina formolada al 0.3% (composición descrita en tabla 3.2); habitualmente, se diluía 0.05 mL de semen en 2.0 mL de solución salina formolada. A continuación, se tomaba una muestra de esta dilución y se llenaba por capilaridad el hemocitómetro o cámara de Thoma-Neubauer, para finalmente observarse en un microscopio óptico a 400 aumentos (Olympus BH2-NIC-2). El número de espermatozoides observado en una superficie de 0.2 mm<sup>2</sup> (80 cuadros pequeños de 0.0025 mm<sup>2</sup> cada uno y distribuidos en 5 cuadrados grandes), era multiplicado por 2.050.000 para obtener la concentración en espermatozoides por mililitro, teniendo en cuenta la dilución realizada (1/41) y el volumen cubierto con el recuento (0.2 mm<sup>2</sup> x 0,1 mm de altura = 0,02 mm<sup>3</sup>).

La concentración espermática de cada muestra se determinaba dos veces, hallándose la media, para determinar su valor. Si los valores diferían más de un 10%, se volvía a repetir la determinación de la concentración espermática, hasta que las dos valoraciones no mostrasen más de un 10% de diferencia.

Únicamente se seleccionaron aquellas muestras que tuviesen una concentración superior a  $250 \times 10^6$  espermatozoides/mL.

### *III. Vitalidad espermática*

El recuento de espermatozoides vivos se llevaba a cabo individualmente en cada uno de los eyaculados recogidos.

Este parámetro se evaluaba utilizando una doble tinción de eosina-nigrosina (Barth y Oko, 1989), descrita en la tabla 3.3. Sobre un portaobjetos a 37 °C, se mezclaba una gota de unos 4-5 mm de diámetro de dicho colorante (mantenido a su vez en un baño María a 37 °C), con otra de 5-6 mm de semen fresco sin diluir, y también mantenido en el baño María a 37 °C. Una vez mezcladas ambas gotas, se deslizaba un portaobjetos, con un ángulo de 30-40°, sobre el primero para obtener una extensión que se secaba rápidamente al aire y se observaba a 400-1000 aumentos en un microscopio óptico (Olympus BH2-NIC-2).

El baremo utilizado para la realización de esta valoración era considerar muertos a todos aquellos espermatozoides que presentaban algún indicio de coloración rosada, indicativo de una alteración de la membrana citoplasmática, y vivos a todos los espermatozoides que mostraban un color totalmente blanco, indicativo que presentaban una membrana funcional que no permitía el paso del colorante. Para obtener el correspondiente porcentaje se valoraban un mínimo de 200 células espermáticas por muestra.

Se consideraron aptos para la experiencia todos los eyaculados que mostraban una vitalidad mínima del 85%. Al igual que la motilidad, la vitalidad espermática fue valorada de manera independiente por dos observadores que desconocían la procedencia de las muestras seminales.

### *IV. Porcentaje de Morfoanomalías*

Para llevar a cabo la valoración de la morfología espermática, se evaluaron un mínimo de 200 espermatozoides por muestra, utilizando la misma extensión de eosina-nigrosina que estaba preparada para la obtención del porcentaje de vitalidad espermática. El porcentaje de espermatozoides con formas anormales se determinó mediante la valoración de las muestras en un microscopio de contraste de fases (Olympus BH2-NIC-2), entre 400-1000 aumentos y se distinguieron las siguientes morfoanomalías:

- espermatozoides con gota citoplasmática proximal
- espermatozoides con gota citoplasmática en la cabeza
- espermatozoides con colas enrolladas
- espermatozoides con colas dobladas
- espermatozoides con macrocefalia
- espermatozoides con microcefalia
- espermatozoides con cabezas, colas o flagelos desprendidos
- espermatozoides con dobles cabezas
- espermatozoides con dobles colas o flagelos

Sólo aquellas muestras que presentasen hasta un máximo del 20% de morfoanomalías, se utilizaron para ser sometidas a los procesos de dilución y crioconservación.

#### *V. Acrosomías*

Finalmente, el porcentaje de espermatozoides con algún tipo de alteración en el acrosoma se determinaba colocando una gota de semen fresco sobre un portaobjetos a 37 °C, posteriormente se deslizaba un portaobjetos sobre esta gota, para finalmente ser sometido a una tinción diferencial (Spermac®, Minitüb). La valoración se llevaba a cabo en un microscopio de contraste de fases (Olympus BH2-NIC-2), a 1000 aumentos con el objetivo de inmersión y de manera general se distinguieron las siguientes acrosomías:

- espermatozoides con acrosoma desprendido
- espermatozoides con acrosoma rugoso
- espermatozoides con defectos en el acrosoma

El número de espermatozoides valorado por muestra era como mínimo de 200. Solamente se seleccionaron aquellos eyaculados que mostraban un porcentaje de acrosomías inferior al 15%.



Tabla 3.2. Solución salina formulada al 0,3% utilizada para hallar la concentración

---

NaCl .....	9 g
Agua destilada.....	hasta 1000 mL
Solución de formaldehído al 40%.....	8 mL

---

Tabla 3.3. Tinción empleada para determinar el porcentaje de espermatozoides vivos (tomado de Barth y Oko, 1989)

---

Eosina B azulada.....	1 g
Nigrosina.....	8 g
Agua destilada.....	hasta 100 mL

---

### 3.1.6. Procedimientos de diluyoconservación seminal

Tras seleccionar aquellas muestras de semen que presentasen una concentración superior a  $250 \times 10^6$  espermatozoides/mL, una motilidad y una vitalidad superiores al 85%, un porcentaje de morfoanomalías y acrosomías menor del 20 y 15%, respectivamente, los eyaculados de cada uno de los ejemplares eran sometidos a los procedimientos de diluyoconservación que a continuación se describen.

En primer lugar, la fracción espermática se sometía a una centrifugación suave a  $700 \times g$  (2200 rpm) en una Centrífuga Kubota 5100 durante 6 minutos, para conseguir una mayor concentración de los espermatozoides. El objetivo de este paso era asegurar la eliminación del pequeño volumen de primera y tercera fracción que hubiese podido mezclarse con la segunda fracción durante las recogidas, y concentrar la fracción espermática.

Una vez retirado el sobrenadante mediante aspiración cuidadosa con pipetas Pasteur, el sedimento resultante se resuspendía suavemente mediante adición a temperatura ambiente del primer diluyente con una pipeta Pasteur o agitando suavemente el tubo colector. En este punto, este primer diluyente contenía una diferente concentración de glicerol, de tal forma que a los eyaculados

individuales de cada perro, se les adicionaba bien Diluyente-1a (Dil-1a) con un 3% de glicerol, o bien Diluyente-1b (Dil-1b) con un 5% de glicerol (Tabla 3.4).

Tabla 3.4. Composición del primer diluyente (Dil-1a, Dil-1b) empleado en la experiencia (por cada 100 ml)

Componentes	Dil-1a	Dil-1b
Tris (Hidrometil) Aminometano (Panreac)	2.4 g	2.4 g
D(+)-Glucosa anhidra (Panreac)	0.8 g	0.8 g
Acido cítrico anhidro (Sigma)	1.4 g	1.4 g
Glicerol -Glicerina- (Panreac)	3 mL	5 mL
Na Bencilpenicilina (Hoechst)	0.06 g	0.06 g
Dihidroestreptomicina sulfato (Hoechst)	0.1 g	0.1 g
Yema de huevo	20 mL	20 mL
Agua destilada	hasta 100 mL	hasta 100 mL

El volumen de primer diluyente (Dil-1a, Dil-1b) que añadíamos se calculaba dividiendo el número total de espermatozoides de la muestra entre  $200 \times 10^6$ , con el objetivo de conseguir que cada mililitro de muestra contuviera  $200 \times 10^6$  espermatozoides y un 3% ó un 5% de glicerol (en función de si se añadía el Dil-1a o el Dil-1b). Este procedimiento se realizaba con sumo cuidado para evitar producir un daño masivo a las células y, de esta forma, también prevenir la formación de un gran número de radicales libres tóxicos para los espermatozoides (Peña, 1997).

El siguiente paso consistía en introducir la mezcla de semen + Dil-1a, o bien, semen + Dil-1b en una cámara frigorífica (Uniblock Zanotti, Mod. AAS 121 PØ2G) a una temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora; esta fase constituía el periodo de equilibrado que persigue obtener un descenso lento de la temperatura de la muestra desde temperatura ambiente hasta  $4^{\circ}\text{C}$ . Durante este periodo de equilibrado se controlaba que la temperatura de la cámara se mantuviese a  $4^{\circ}\text{C}$  durante todo momento, mediante la utilización de un termómetro Crison 638 PT con sonda de ambiente.

Simultáneamente a la colocación de esta primera dilución en el interior de la cámara frigorífica, también se depositaba en su interior, el diluyente 2 (Dil-2), con una composición de 2.4 g de TRIS, 1.4 g de ácido cítrico, 0.8 g de glucosa, 0.06 g de Na Bencilpenicilina, 0.1 g de

dihidroestreptomicina sulfato, 20 mL de yema de huevo, 7 mL de glicerol, 1 mL (v/v) de Equex (Equex STM paste; Nova Chemical Sales Inc.) y se completaba con agua destilada hasta un volumen de 100 mL. Este segundo diluyente se colocaba en la cámara frigorífica en el interior de jeringas; asimismo, también se depositaban pajuelas de 0.5 mL, perfectamente identificadas. El volumen de Dil-2 que se debía añadir era igual al del primer diluyente; con ello se pretendía obtener una dilución final en la que cada mililitro contuviese  $100 \times 10^6$  espermatozoides, 0.5% de Equex y 5% ó 6% de glicerol (en función de si se añadía el Dil-1a o el Dil-1b). El número total de pajuelas que se debían depositar en el interior de la cámara frigorífica se determinaba en función del volumen final de la dilución (Dil-1 + Dil-2).

Una vez transcurrida la hora de equilibrado y antes de proceder a la adición del Dil-2, se tomaba una alícuota de la primera dilución, para valorar la motilidad y vitalidad espermáticas tras el periodo de equilibración. Estas valoraciones se realizaron utilizando los mismos métodos que los descritos para el semen en fresco.

Posteriormente, y siempre trabajando en el interior de la cámara frigorífica a 4 °C, se procedía a mezclar el Dil-2, con el semen diluido (semen + Dil-1a o semen + Dil-1b). Este proceso se llevaba a cabo con mucho cuidado, para conseguir realizar una mezcla de forma suave y continua, evitando así una exposición brusca de la muestra a este segundo diluyente, que al contener una mayor proporción de glicerol podría dañar a los espermatozoides.

El siguiente paso consistía en envasar la dilución final en las pajuelas de 0.5 mL. Las pajuelas se llenaron, dejando una cámara de aire de aproximadamente 1 cm de longitud en el extremo abierto de la pajuela, para evitar el contacto directo del semen con el sistema de sellado. Finalmente, las pajuelas fueron selladas mediante la colocación de micropelotas de plástico. El envasado nunca tuvo una duración superior a 15 minutos, pasados los cuales se procedió a realizar la congelación de las pajuelas.

Tras la adición del Dil-2, de cada una de las diluciones finales se tomaba una pequeña muestra, para asegurar que no había ocurrido un detrimento en la motilidad y la vitalidad post-equilibrado superior al 5%. Estas evaluaciones se realizaron utilizando los mismos métodos descritos para el semen en fresco.

### 3.1.7. Protocolos de congelación y conservación seminal

Se llevaron a cabo un total de 15 protocolos de congelación entre los meses de diciembre de 2003 a marzo de 2004. A cada ejemplar se le realizó un número de recogidas necesario para obtener 160 pajuelas por perro, y dividir las de tal manera que 80 pajuelas contuviesen el Dil-1a y las otras 80 el Dil-1b. La figura 3.2. esquematiza el número final de pajuelas definidas en cada protocolo de dilución, y los diferentes procedimientos de congelación a los que fueron sometidos.

#### 3.1.7.1. Congelación en nitrógeno líquido (NL)

Para este protocolo, todas las actuaciones se realizaron en el interior de la cámara frigorífica a una temperatura de 4 °C. En primer lugar, se dispuso de una caja de poliestireno, a la que se añadía la cantidad necesaria de nitrógeno líquido para llevar a cabo el posterior procedimiento de congelación. A continuación, una rampa metálica para congelación de pajuelas se situaba en el interior de la caja, de tal forma que la distancia entre la superficie del nitrógeno líquido y el estante se situase entre 4-5 cm.

Las pajuelas, situadas sobre el estante a 4 cm sobre la superficie del nitrógeno líquido, fueron expuestas durante 15 minutos a los efectos de los vapores del nitrógeno líquido cuya temperatura oscilaba entre -110 a -120 °C. Un termómetro Crison TM 65 con sonda de inmersión introducida a nivel de las pajuelas, monitorizaba el descenso de la temperatura en todo momento para verificar las condiciones del proceso (rampa de descenso de temperatura: 10 °C/minuto desde 4 a -5 °C; 3.5 °C/minuto desde -5 a -15 °C; y finalmente, 14 °C/minuto desde -15 a -110 °C). Por último, las pajuelas fueron sumergidas en el interior del nitrógeno líquido y se conservaban en un contenedor con nitrógeno líquido (Criocontenedor MVE, XC 47/11-10). A lo largo de toda la experiencia, el criocontenedor se iba rellenando periódicamente con nitrógeno líquido.

#### 3.1.7.2. Congelación en ultracongelador de -152 °C (ULF)

Una vez que se finalizaba el envasado del semen y pasados los 15 minutos desde que se le añadía el Dil-2, las pajuelas se trasladaban directamente desde la cámara frigorífica hasta el ultracongelador de -152 °C. Para llevar a cabo este transporte, las pajuelas se depositaron en el interior de *globelets* perfectamente identificados y se trasladaron dentro de una nevera portátil a 4 °C, antes de introducirlas en el interior del ultracongelador de -152 °C. El tiempo empleado para trasladar las pajuelas nunca fue superior a 10 segundos.

El modelo de ultracongelador (*Foto 1*) empleado fue el Sanyo – 152 °C (MDF-1155 ATN, Sanyo Electric Co. Japan) equipado con un microprocesador de temperatura que mantiene el interior del congelador a – 152 °C. Antes de comenzar la experiencia, la curva de descenso de temperatura del ultracongelador de – 152 °C fue monitorizada, mediante un termómetro Crison TM 65, con sonda de inmersión introducida en el ultracongelador a la altura de las pajuelas. Se pudo comprobar que ocurría un descenso lento de temperatura (- 5 °C/minuto) desde 5 °C a – 10 °C, y un descenso rápido (- 30 °C/minuto) desde – 10 °C a – 100 °C; por debajo de esta temperatura, la curva de congelación era de – 10 °C/minuto desde –100 °C a –140 °C.

Este ultracongelador se alimenta de corriente eléctrica. Posee un volumen total de 160 litros de capacidad, lo que representa un total de 35-40 *canisters* (*Foto 2*), en cuyo interior se pueden disponer un total de 16 recipientes de plástico donde se almacenan 15 pajuelas por recipiente; por lo tanto, el ultracongelador de -152 °C sería capaz de almacenar aproximadamente 10000 pajuelas de 0.5 mL.

### 3.1.8. Descongelación y valoración de la calidad seminal post-descongelación

El número total de pajuelas de cada tipo de diluyente (80 pajuelas) se distribuyó uniformemente, de tal forma que fuese posible realizar 5 descongelaciones de cada una de las técnicas de congelación los días 1, 30, 90, 180 y 365 post-congelación; es decir, el número de pajuelas valorada en cada día (1, 30, 90, 180, 365 post-congelación) y para cada técnica de congelación (NL, ULF) fue de 8 (Figura 3.2). Las descongelaciones comenzaron en diciembre del 2003 y finalizaron en mayo del 2005.

La técnica de descongelación consistía en sumergir completamente las pajuelas en un baño María a 70 °C durante 8 segundos. Posteriormente, tras el secado de las pajuelas para evitar que penetrase agua en su interior, el contenido de cada pajuela se introducía en 2 mL (dilución 1:4) de solución tampón de TRIS-glucosa (2.4 g de TRIS, 1.4 g de ácido cítrico, 0.8 g de glucosa, 0.06 g de Na Bencilpenicilina, 0.1 g de dihidroestreptomycin sulfato y se completaba hasta 100 mL con agua destilada) a 37 °C, manteniéndose a esta temperatura durante todo el proceso de contrastación seminal.

En el semen descongelado, se valoraron una serie de parámetros para determinar su calidad utilizando exactamente los mismos procedimientos que los usados en el semen fresco. En las muestras descongeladas se evaluaron la motilidad individual progresiva, la vitalidad espermática y los porcentajes de morfoanomalías y acrosomías. La motilidad espermática se valoró a los 5

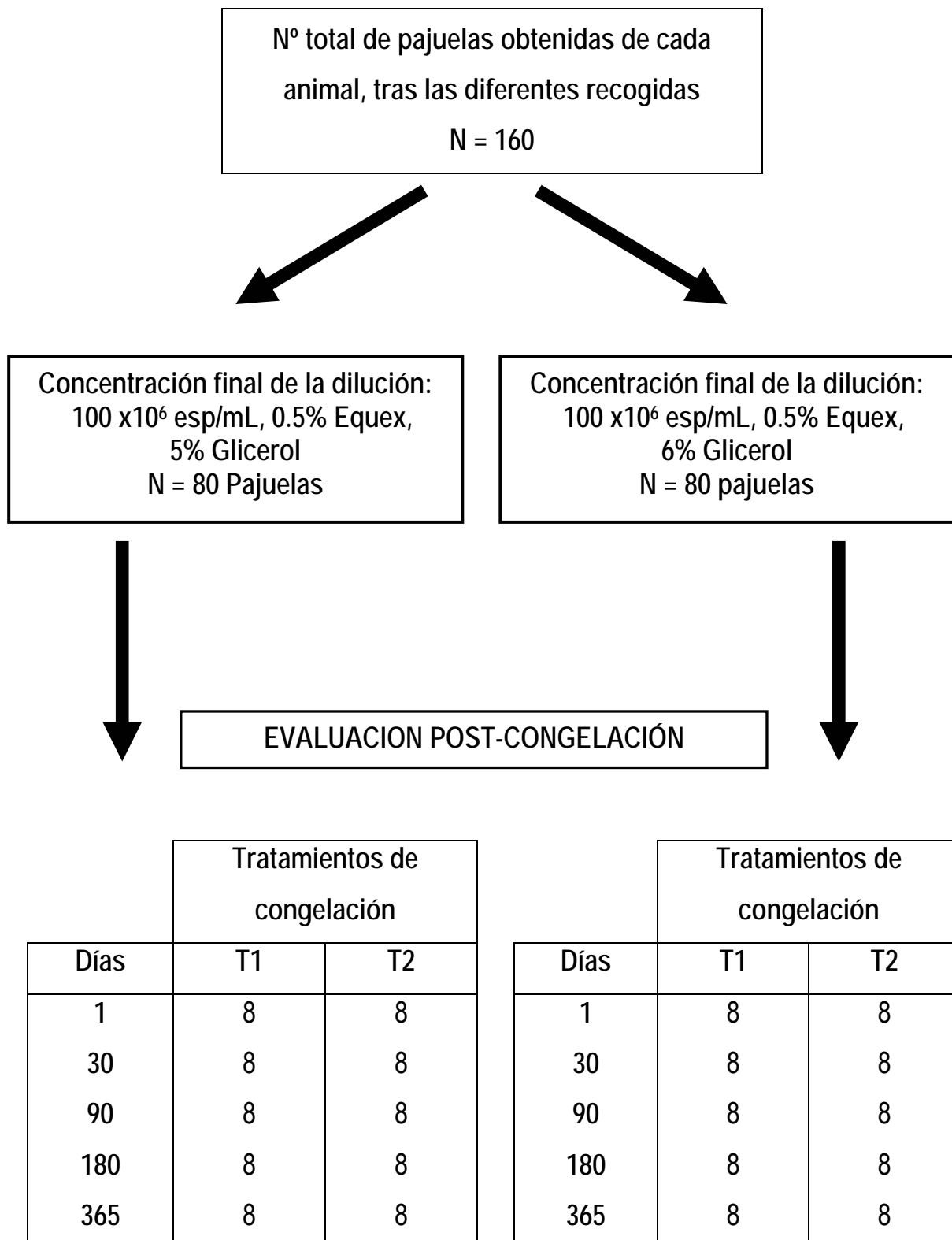
minutos tras la descongelación, y posteriormente fue evaluada 1, 2, 4 y 6 horas tras la descongelación. El resto de parámetros seminales sólo fueron evaluados inmediatamente tras la descongelación.

### **3.1.9. Análisis estadístico**

Para valorar las características de los diferentes parámetros seminales, los datos de motilidad espermática, vitalidad espermática, porcentaje de morfoanomalías y porcentaje de acrosomías se sometieron a un análisis repetido de varianza mediante el programa SPSS 10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), de acuerdo con un modelo lineal que consideraba los efectos de los machos (8 animales), los procedimientos de dilución (2 técnicas), los protocolos de congelación (dos protocolos), el tiempo de valoración (1, 30, 90, 180 y 365 días) y las interacciones entre ellos.

Todos los valores expresados como porcentajes (motilidad, vitalidad, morfoanoamalias y acrosomías) fueron sometidos a una transformación arcsénica, antes de proceder a su análisis. Los valores se consideraron significativos cuando  $p < 0.05$ .

Figura 3.2. Número de pajuelas valoradas para cada macho, en función del medio de dilución, procedimiento de congelación y día post-congelación evaluado



T1: Congelación y conservación en ultracongelador de – 152 °C. T2: Congelación y conservación en nitrógeno líquido.



Foto 1. Ultracongelador de  $-152^{\circ}\text{C}$ : visión frontal

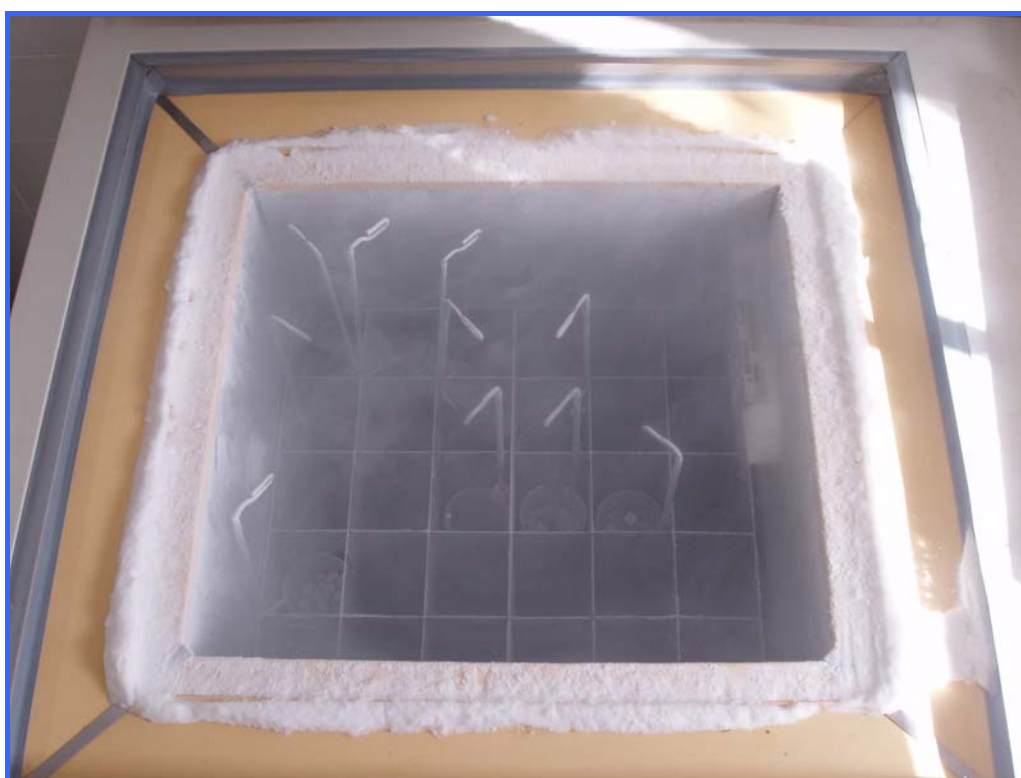


Foto 2. Ultracongelador de  $-152^{\circ}\text{C}$ : detalle de la distribución de canisters y almacenamiento de pajuelas



## 3.2. INDUCCION DEL CELO, INSEMINACION ARTIFICIAL Y TASA DE FERTILIDAD

### 3.2.1. Animales

#### 3.2.1.1. Hembras

Se utilizaron 8 hembras de la raza Beagle, con edades que oscilaban entre 14-15 meses de edad, un peso medio de 11.3 kilos, y que habían alcanzando la pubertad como mínimo 4 meses antes del comienzo de la experiencia.

Previo al inicio de la fase experimental, las perras se sometieron a un profundo examen de su estado reproductivo, que incluía una evaluación externa de la vulva y vagina, citologías vaginales seriadas, la localización y palpación transabdominal del cuello uterino, y una evaluación ecográfica del útero y los ovarios. La metodología empleada en estas evaluaciones se describe a lo largo de este estudio.

Las hembras se encontraban alojadas en las instalaciones de la Granja de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria y consistían en corrales de 18 m<sup>2</sup> que disponían de una zona cubierta y un patio de recreo al aire libre. Las hembras se distribuyeron en 4 boxes con 2 hembras en cada uno, por tanto, con una superficie útil por animal de unos 9 m<sup>2</sup>.

La alimentación consistía en pienso de mantenimiento (350 gramos/día/animal HPR15, Hill's maintenance) durante todo el periodo experimental. Cuando se confirmaba que las hembras se encontraban preñadas, se administraba una dieta más rica (350 gramos/día/animal; HP15 Hill's puppy). Todos los corrales disponían de un bebedero automático y agua *ad libitum*.

Las hembras se encontraban vacunadas contra moquillo, leptospirosis y hepatitis (Canigen®, Virbac), parvovirus (Parvigen®, Virbac) y rabia (Rabdomun®, Schering-Plough). Asimismo, los animales eran desparasitados periódicamente tanto de ectoparásitos (Fipronil 0,25%, Front-Line®, Merial), como de endoparásitos, mediante la administración de ivermectina y pirantel (Cardotek-30 Plus®, Merial), oxiendazol y niclosamida (Vitaminthe®, Virbac) y praziquantel (Zipyran®, Calier).

### 3.2.1.2. Machos

Se utilizó 1 macho de la raza Beagle, con 3 años de edad y 15,2 kilos de peso, perteneciente a nuestra unidad. La alimentación, alojamiento y plan sanitario de este animal era similar al descrito previamente para las hembras.

Antes del comienzo de la experiencia, se comprobó que el estado general del animal era correcto, así como se llevó a cabo un profuso estudio del estado reproductivo del animal que incluía una inspección minuciosa de los genitales externos, ecografías de próstata y testículos, así como espermigramas seriados. Asimismo, se había comprobado que el macho era fértil, que se mostraba sexualmente activo y respondía adecuadamente a las maniobras de estimulación manual, completando la eyaculación.

### 3.2.2. Planificación del trabajo experimental

La segunda fase de la tesis (Figura 3.3) pretendía establecer la tasa de fertilidad tras inseminar con semen criopreservado mediante ultracongeladores de  $-152\text{ }^{\circ}\text{C}$  (n=5) y mediante nitrógeno líquido (n=5), tras un periodo de conservación del semen superior a 5 meses.

Las hembras fueron sometidas a un tratamiento de inducción del celo y ovulación, valorando la evolución del ciclo sexual mediante la realización e interpretación de citologías vaginales seriadas, el aspecto de la mucosa vaginal y la determinación de los niveles plasmáticos de progesterona. Tras la inseminación artificial, se realizaron diagnósticos de gestación y se determinó la prolificidad final, según se indica en la figura 3.3.

Al igual que la primera fase, la segunda parte del trabajo experimental se desarrolló de acuerdo con la legislación española y europea relativa a la investigación y experimentación animal.

**Figura 3.3. Diseño del plan experimental de las pruebas de fertilidad *in vivo***

	TRATAMIENTO DE INDUCCION						PROESTRO	ESTRO	DIESTRO-GESTACION						
	Días con respecto al inicio del sangrado (día 0)								Días con respecto a la finalización del periodo de inseminaciones						
IT	- 15	-12	-9	-6	-3	0			2	4	6	8	24-26	45-50	58-62
C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
									IA	IA	IA	IA	DG	DG	CP

IT: Inicio del tratamiento con cabergolina

C: Toma de muestras para citología vaginal

S: Extracción de sangre para determinar los niveles plasmáticos de progesterona

IA: Inseminación artificial

DG: Diagnóstico de Gestación

CP: Control del parto

### 3.2.3. Recogida, contrastación y crioconservación de las muestras seminales

Los procedimientos de recogida y contrastación seminal eran bastantes similares a los descritos en la primera fase de este trabajo experimental: la motilidad individual progresiva, la vitalidad espermática y el porcentaje de morfoanomalías se determinaron de la misma forma. No obstante, la concentración de espermatozoides se valoraba tanto mediante la utilización de una cámara Thoma-Neubauer, como mediante la utilización de un fotómetro previamente calibrado (Spermacue®, Minitüb). Del mismo modo, el porcentaje de acrosomías (Nöthling y Shuttleworth, 2005) se determinaba mediante la utilización de una tinción diferencial (Spermac®, Minitüb).

El nº de recogidas realizadas a nuestro macho fueron 8, suficientes para obtener un número final de 100 pajuelas que se utilizaron en esta segunda fase del trabajo experimental. Tras su recogida y evaluación, los eyaculados seleccionados presentaban una motilidad individual progresiva superior al 85%, una vitalidad > 90%, un porcentaje de morfoanomalías y acrosomías inferior al 10% y una concentración superior a los  $300 \times 10^6$  espermatozoides/mL. El periodo de las congelaciones seminales se desarrolló entre enero y diciembre de 2005.

Los procedimientos de diluyoconservación fueron similares a los descritos en la primera fase del trabajo experimental, si bien se optó por utilizar sólo el diluyente cuya concentración final era de un 5% de glicerol. Brevemente, tras la centrifugación y la retirada del sobrenadante, se añadía el diluyente-1a (2.4 g de TRIS, 1.4 g de ácido cítrico, 0.8 g de glucosa, 0.06 g de Na Bencilpenicilina, 0.1 g de dihidroestreptomocina sulfato, 20 mL de yema de huevo, 3 mL de glicerol y se completaba con agua destilada hasta un volumen de 100 mL), en volumen suficiente para obtener que cada mililitro de muestra contuviera  $200 \times 10^6$  espermatozoides y un 3% de glicerol. Esta dilución se introducía en una cámara frigorífica a 4 °C, durante 1 hora. Al mismo tiempo, se introducía también en la cámara el diluyente 2 (2.4 g de TRIS, 1.4 g de ácido cítrico, 0.8 g de glucosa, 0.06 g de Na Bencilpenicilina, 0.1 g de dihidroestreptomocina sulfato, 20 mL de yema de huevo, 7 mL de glicerol, 1 mL de Equex STM paste y se completaba con agua destilada hasta un volumen de 100 mL) para que se fuese atemperando a 4 °C.

Una vez finalizado el periodo de equilibrado y tras comprobar que la motilidad y vitalidad no se habían modificado, se añadía el diluyente 2 a la mezcla del semen + diluyente-1a. A continuación, se procedía al envasado de esta última dilución en pajuelas de 0.5 mL (concentración final de  $100 \times 10^6$  espermatozoides/mL, 5% glicerol y Equex 0.5%), se sellaban

con micropelotas de plástico y se distribuían uniformemente antes de comenzar con los protocolos de congelación.

Finalmente, el semen fue sometido al proceso de congelación mediante los procedimientos descritos en la primera parte de este trabajo experimental: congelación en nitrógeno líquido (NL) y congelación en ultracongelador de -152 °C (ULF).

#### **3.2.4. Tratamiento de inducción del celo y la ovulación**

Antes de comenzar los tratamientos de inducción del celo, se determinaba la fase del ciclo estral en que se encontraba la hembra. Puesto que todas las hembras habían manifestado su primer celo antes de los 11 meses, se conocía con exactitud el periodo transcurrido desde el final del celo. Por tanto, el tratamiento de inducción se iniciaba como mínimo unos 4 meses tras el final del último celo. Del mismo modo, se tomaban muestras de citología vaginal, que se teñían e interpretaban (descripción en el siguiente apartado), corroborando la existencia de un patrón celular típico de anoestro (Concannon y DiGregorio, 1986). Asimismo, se determinaron los niveles plasmáticos de progesterona (mediante radioinmunoensayo, apartado 3.2.8), observando que mostraban valores típicos de anoestro (< 1 ng/mL; Jeffcoate, 2000).

El tratamiento de inducción del celo y la ovulación que se utilizó fue la cabergolina (Galastop®, Esteve), a una dosis diaria de 0.005 mg/kg de peso vivo por vía oral (Verstegen y cols., 1999; Rota y cols., 2003). La administración de cabergolina se realizaba hasta 2 días tras la aparición de los primeros signos evidentes del proestro (edema vulvar y sangrado vaginal). El tratamiento se administraba siempre de forma sistemática, por el mismo técnico y a la misma hora (17:00 horas). Tras la administración del tratamiento se monitorizaba a las hembras para controlar la presentación de posibles efectos secundarios, tales como náuseas, vómitos o cualquier otro proceso indeseable.

Los tratamientos de inducción comenzaron en abril de 2005 y finalizaron en mayo de 2006. De las 8 hembras, dos se sometieron a 2 tratamientos de inducción y otras 6 sólo experimentaron un tratamiento; por tanto, el nº final de tratamientos de inducción fue de 10. Aquellas hembras que experimentaron dos tratamientos de inducción, se les permitió que tuvieron un estro fisiológico entre ambos protocolos de tratamientos.

### 3.2.5. Extracción, tinción e interpretación de las citologías vaginales

Para evaluar la efectividad del tratamiento de inducción y confirmar la fase del ciclo sexual en que se encontraban las hembras en cada momento, se realizaron citologías vaginales seriadas cada 3 días, tomando 2 muestras por día, comenzando el primer día de administración de la cabergolina. Cuando se detectaron cambios significativos en el patrón celular, así como el inicio de los primeros signos evidentes de celo (edema vulvar y sangrado), se empezaban a tomar muestras diarias hasta el inicio de las inseminaciones artificiales. Durante el periodo de inseminaciones, se continuaban tomando las muestras de citología vaginal a diario y una vez finalizada la última inseminación, se volvían a tomar las muestras cada 2 días hasta un total de cuatro muestras post-inseminación.

Para la toma de muestras, se limpiaba previamente la región vulvar mediante la utilización de solución salina atemperada y gasas estériles. A continuación, se introducía un espéculo vaginal, estéril y lubricado con gel, a través de los labios vulvares, con la inclinación suficiente para salvar el vestíbulo vaginal y evitar la posible contaminación bacteriana procedente de la región más externa de la vulva, de la fosa del clítoris o del meato urinario. Una vez en el interior de la vagina, el espéculo se abría lo suficiente para permitir introducir un hisopo estéril, ligeramente humedecido en suero fisiológico, que se deslizaba suavemente por las paredes internas del espéculo, para finalmente realizar un leve barrido del techo y suelo de la mucosa vaginal; posteriormente, se retiraba el hisopo deslizándolo nuevamente por las paredes internas del espéculo. Por último, una vez retirado el espéculo, se llevaba a cabo una extensión del hisopo sobre varios portaobjetos y se dejaba secar al aire.

Tras el periodo de secado, las muestras eran sometidas al proceso de tinción. Se utilizó un método de tinción diferencial, Diff-Quick, realizando la tinción en un tiempo inferior a 2 minutos tras la recogida. Finalmente, se procedía a su valoración mediante la utilización de un microscopio Olympus BH2-NIC-2, a 200-400 aumentos, valorándose un mínimo de 200 células para obtener el correspondiente porcentaje.

Las células que se valoraban para determinar la fase del ciclo estral en que se encontraba la perra fueron las células del epitelio vaginal. Para ello, se utilizaba la división celular establecida por Olson y cols. (1984), que clasifica a las células vaginales en 4 tipos celulares:

- Células parabasales

- Células intermedias pequeñas
- Células intermedias grandes
- Células superficiales: en este grupo se distinguían las nucleadas y no nucleadas.

Asimismo, además de las células propias del epitelio vaginal, se valoraba la presencia de neutrófilos, hematíes u otras estructuras celulares presentes en la muestra.

Se consideraba que la perra iniciaba el proestro, cuando junto con la presencia de edema vulvar y descarga vaginal serosanguinolenta, el patrón celular mostraba un incremento de las células intermedias (pequeñas y grandes), una disminución de las células parabasales y presencia de abundantes hematíes. Se definió que la hembra se encontraba en proestro avanzado cuando del frotis desaparecían las células parabasales, y al menos un 50% de células presentes en la muestra eran células superficiales queratinizadas (Johnston y cols., 2001).

Se consideraba que la perra se encontraba iniciando el estro cuando presentaba un patrón celular con al menos un 80% de células superficiales queratinizadas (Pinto y cols., 1999; Johnston y cols., 2001).

Se consideraba que la perra había finalizado el estro y se encontraba en diestro, cuando en el frotis vaginal, se producía un descenso de al menos un 10-20% en el número de células superficiales y la reaparición progresiva de las células parabasales e intermedias pequeñas (Concannon y DiGregorio, 1986).

Las muestras se tomaban siempre a la misma hora y fueron valoradas por un mismo observador, que desconocía la procedencia de la muestra.

### 3.2.6. Extracción de muestras sanguíneas

Con objeto de determinar la concentración plasmática de progesterona y por tanto, definir el momento aproximado del pico de LH y la ovulación, se realizaron extracciones seriadas de sangre. La periodicidad con que se extraían las muestras era exactamente la misma que para la toma de citologías; por lo tanto, se obtenían cada tres días hasta la aparición de signos evidentes de proestro, y desde ese momento y hasta la última de las inseminaciones, la toma de muestras fue diaria. Tras la última inseminación se extrajeron 4 muestras más de sangre, con dos días de diferencia entre extracciones, es decir, hasta 8 días tras la última inseminación. Las

muestras se obtenían utilizando un tubo de vacío con heparina (Venoject Terumo), mediante punción de la vena yugular, previo rasurado y desinfección de la zona.

A continuación, la sangre se centrifugaba a 1000 x g durante 15 minutos en una centrífuga Kubota 5100. Posteriormente, se recogía el sobrenadante mediante una pipeta Pasteur y se congelaba a – 80 °C en tubos de polipropileno de 2 mL, hasta el momento en que se realizaba la determinación laboratorial de la concentración hormonal.

### 3.2.7. Momento y procedimiento de la inseminación artificial

Como las determinaciones hormonales se realizaron una vez que finalizaron los protocolos de inseminación, el momento óptimo de inseminación artificial se determinaba cuando las hembras cumplían todos y cada uno de los siguientes requisitos:

1. La citología vaginal mostraba al menos un 80% de células superficiales queratinizadas.
2. La mucosa vaginal presentaba un aspecto pálido, con pérdida manifiesta del edema.
3. Cuando al aproximar un macho sexualmente activo, la hembra permitía el acercamiento y los intentos de monta.
4. Cuando al realizar la inseminación artificial, el catéter de inseminación atravesaba con facilidad el cuello uterino.

Las hembras se dividieron al azar en dos grupos experimentales: 5 hembras fueron inseminadas con semen congelado en nitrógeno líquido y otras 5 fueron inseminadas con semen congelado en el ultracongelador de – 152 °C; para ambos protocolos, las dosis seminales utilizadas presentaban un periodo de crioconservación entre 5 y 6 meses. Una vez determinado el momento óptimo para realizar la inseminación artificial, se utilizaba un total de  $100 \times 10^6$  espermatozoides al día (2 pajuelas) para inseminar a cada hembra.

En primer lugar, se descongelaban las dos pajuelas, sumergiéndolas en un baño María, a 70 °C durante 8 segundos. Una vez descongelada, la muestra se depositaba en una solución tampón de Tris-glucosa (2.4 g de TRIS, 1.4 g de ácido cítrico, 0.8 g de glucosa, 0.06 g de Na Bencilpenicilina, 0.1 g de dihidroestreptomina sulfato y se completaba hasta 100 mL con agua destilada) a 37 °C, se tomaba una alícuota de cada muestra y se realizaba una valoración de la motilidad individual progresiva, utilizando un microscopio Olympus BH2-NIC-2, con placa calefactora (37 °C), a 100-200 aumentos. La finalidad era determinar el porcentaje de motilidad



post-descongelación de la muestra, usando exclusivamente aquellas muestras que presentasen una motilidad individual progresiva superior al 55%. Una vez valoradas individualmente, las dos pajuelas se mezclaban para valorar la motilidad final.

Una vez comprobada la motilidad final (> 55 %), se cargaba la muestra de semen diluido (3 mL de volumen total) en una jeringa de 5 mL, atemperada a 37 °C y se depositaba sobre una placa calefactora a 37 °C. A continuación, se procedía a la introducción de un catéter por vía transvaginal (*Foto 3*); el catéter utilizado era una modificación de un catéter de inseminación para la especie caprina, de aproximadamente unos 35 cm de longitud, al que se acoplaba una vaina de inseminación, lubricada con un gel estéril, no espermicida.

En primer lugar, se introducía el catéter por vía transvaginal con la dirección adecuada para salvar el vestíbulo vaginal, para posteriormente, mediante palpación transabdominal, controlar la progresión del catéter de inseminación (*Foto 4*); en este momento, tras localizar el cuello uterino por vía transabdominal, se procedía a alinear el cervix y el catéter, para finalmente atravesar el canal cervical mediante cuidadosas maniobras de avance del catéter. Se consideraba que el cervix se encontraba apto para ser atravesado, cuando no existía dificultad en la progresión del catéter. La manipulación del catéter siempre se realizaba con extremo cuidado, para evitar laceraciones de la mucosa vaginal o del cuello uterino. El tiempo empleado en atravesar el cuello del útero con el catéter de inseminación nunca fue superior a 1 minuto.

Una vez que, por palpación transabdominal, se pudiese identificar claramente el extremo anterior del catéter por delante del cuello uterino, se procedía a retirar este catéter, pero dejando dentro del útero la vaina de inseminación (*Foto 5*). En este momento, se conectaba la jeringa cargada de semen a la vaina de inseminación (*Foto 6*) y se depositaba el semen en el interior del útero, controlando que no quedaran restos de semen en el interior de la vaina y evitar el reflujo. Finalmente, se retiraba la vaina de inseminación y se colocaba a la hembra con los cuartos traseros elevados durante 15 minutos, dando un ligero masaje en la vulva para favorecer las contracciones uterinas y favorecer el ascenso del semen por los cuernos uterinos. Cuando finalizaba el procedimiento, durante un periodo de 10 minutos, se controlaba si la hembra manifestaba pérdida de semen o cualquier otro flujo a través de la vagina.

El número de inseminaciones que se realizaba en cada hembra osciló entre 3-4, realizadas en días consecutivos y a una hora similar.

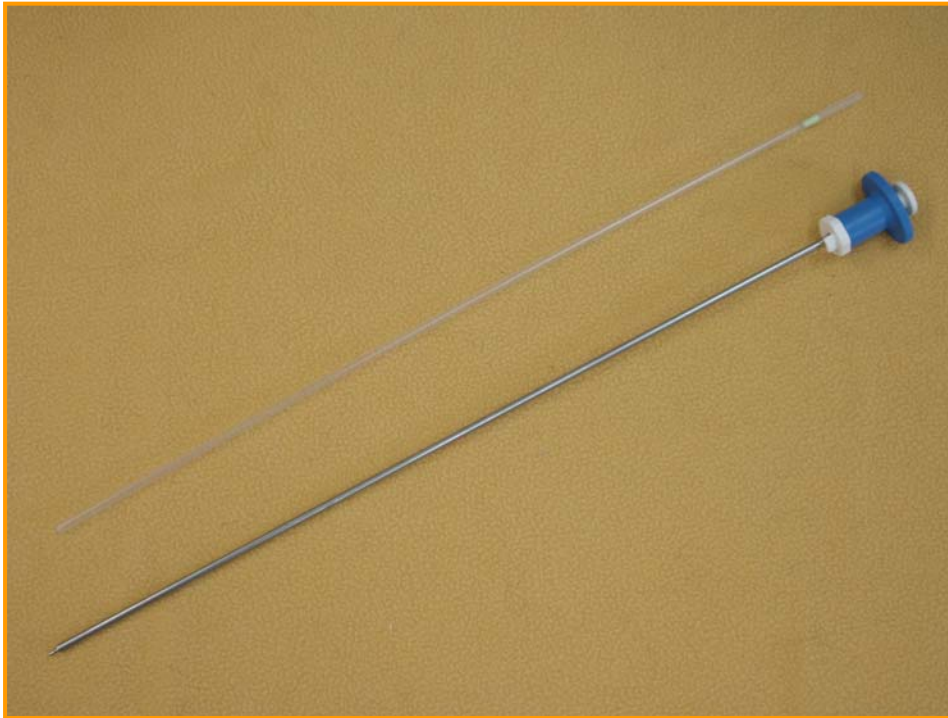


Foto 3. Catéter y vaina de inseminación



Foto 4. Inserción del catéter de inseminación. Localización transabdominal del cuello uterino

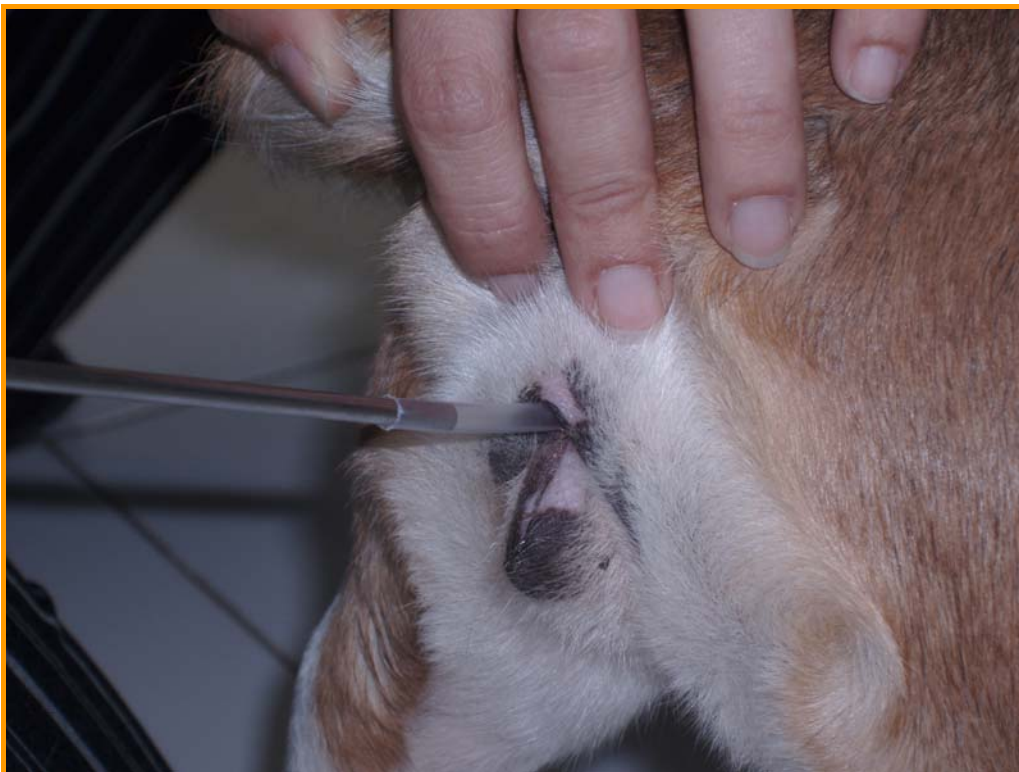


Foto 5. Retirada del catéter de inseminación, dejando la vaina a nivel intrauterino

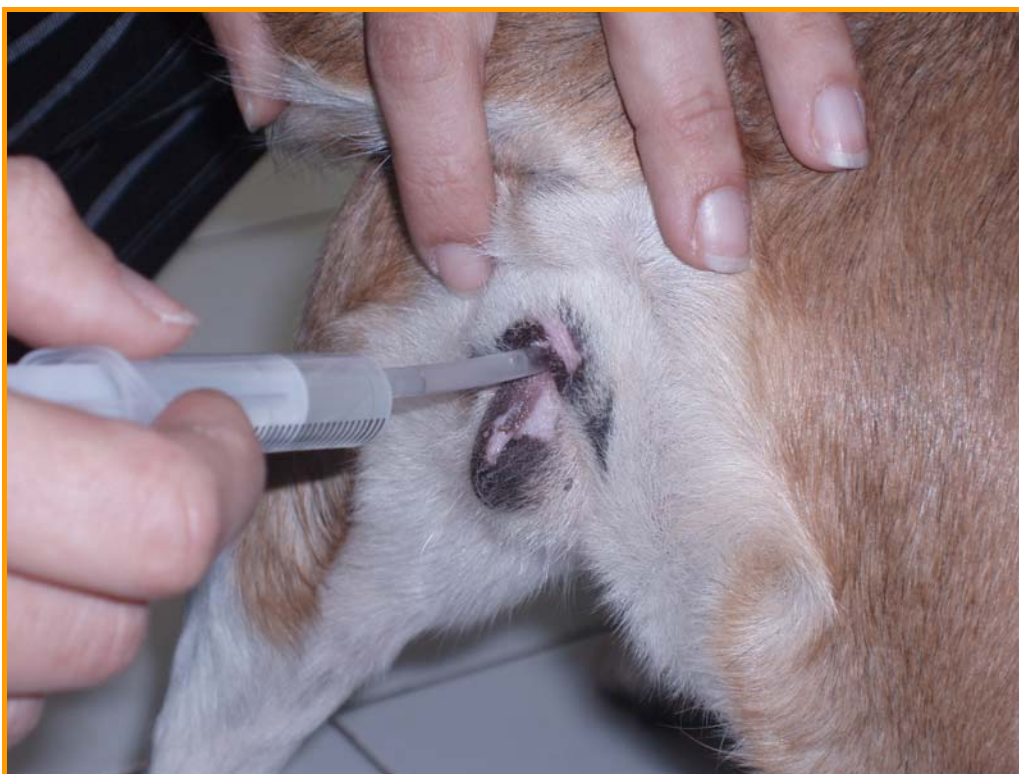


Foto 6. Introducción de la dilución seminal a través de la vaina de inseminación

### 3.2.8. Determinación de los niveles plasmáticos de progesterona

Los niveles plasmáticos de progesterona se determinaron en el laboratorio de Endocrinología de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Las concentraciones de progesterona se midieron mediante radioinmunoanálisis (Srikandakumar y cols., 1986; Concannon y cols., 1987), utilizando un kit comercial (Coat-to-Count TKPG5-TKE25, Diagnostic Products Corp., Los Angeles, CA), siguiendo las indicaciones del fabricante. Este procedimiento utiliza el método directo, siendo su principio básico la competición entre un antígeno radiactivo y otro no radiactivo por una cantidad fija de lugares de unión a anticuerpos. La cantidad del esteroide marcada con  $I^{125}$  unida al anticuerpo sería inversamente proporcional a la concentración presente de esteroide no unido.

En primer lugar, se descongelaban las muestras problemas, hasta que alcanzaban la temperatura ambiente de nuestro laboratorio (20-22 °C). Posteriormente, se preparaban por duplicado tubos para determinar las cuentas totales, unión inespecífica, estándares, controles y muestras problemas. Para la progesterona, la curva estándar se preparaba para que presentase un rango que oscilase entre 0.1 y 40 ng/mL de progesterona en suero, utilizando azida sódica como agente conservante. Tras la preparación de la curva estándar, se añadieron a cada tubo 100  $\mu$ l de cada muestra problema (por duplicado), excepto a los tubos para unión inespecífica y para cuentas totales, y 1 mL de reactivo con progesterona marcada con  $I^{125}$  a todos los tubos (1 mL/tubo). Tras agitación con agitador Multivortex (Modelo Reax-2000; Heidolph), se cubrieron y se sometieron a un periodo de incubación de 1 hora, a 37 °C en un baño María.

Tras el periodo de incubación, se decantaban todos los tubos (excepto los tubos de cuentas totales), sobre un dispositivo para residuos radiactivos. Los tubos se dejaban que drenasen sobre papel absorbente durante 30 segundos, eliminando cualquier residuo que pudiese encontrarse adherido al borde de los tubos. Finalmente, la radiactividad ligada a los tubos se valoraba en un contador gamma (Wizard Wallac, modelo 1470), que determina un número de cuentas inversamente proporcional a la cantidad de muestra presente en los tubos problemas. La sensibilidad del ensayo fue de 0.15 ng/mL y los coeficientes de variación intraensayo del 3% y 15.8%, para unas muestras conocidas con baja (0.2 ng/mL) y alta (12 ng/mL) concentración de progesterona, respectivamente.

Los análisis de progesterona se realizaron una vez finalizados el periodo de inseminaciones de la totalidad de las hembras, llevándose a cabo en un solo análisis, para reducir las posibilidades de modificaciones entre diferentes ensayos.

### 3.2.9. Diagnóstico de gestación

Para determinar la efectividad de las inseminaciones, se procedía a realizar un diagnóstico de gestación mediante la utilización de ultrasonografía transabdominal. Entre 26 y 28 días tras la última inseminación, se realizaba un primer diagnóstico de gestación, colocando al animal en decúbito supino y se procedía a la exploración de la zona de proyección de los cuernos uterinos mediante la utilización de un ecógrafo Aloka SSD-500, provisto de sondas lineales de 3.5, 5.0 y 7.5 MHz.

En primer lugar, se localizaba la vejiga de la orina que se utilizaba como ventana ecogénica o punto de referencia y, posteriormente, se desplazaba la sonda por la zona de proyección del área genital, intentando detectar la presencia de vesículas embrionarias en alguno de los cuernos uterinos. Si no se localizaba ninguna vesícula embrionaria, se calificaba a la hembra como no gestante y se repetía el examen ultrasonográfico 2, 4 y 6 días después, para confirmar la ausencia de gestación.

En el caso que se comprobaba la existencia de vesículas embrionarias, se confirmaba la presencia de un embrión con latido cardíaco en su interior; asimismo, se intentaba determinar el nº de vesículas embrionarias presentes en los cuernos uterinos. Si los embriones no se podían detectar con claridad, se repetía la ecografía cada dos días hasta confirmar, con absoluta seguridad, la presencia de un embrión vivo. Finalmente, se volvía a repetir una ecografía de control a los 45-50 días tras la última inseminación, para confirmar la progresión de la gestación y el estado de los fetos.

### 3.2.10. Parto y tamaño de la camada

Alrededor de 2 semanas antes de la fecha prevista del parto, aquellas hembras diagnosticadas como gestantes, se trasladaron a nuevos boxes, que habían sido acondicionados como parideras.

Cuando comenzaron los signos de parto, se monitorizó constantemente la progresión del mismo, interviniendo en aquellos momentos donde la actuación veterinaria fuese necesaria.

Asimismo, se determinaba el tamaño final de la camada y se realizaba una minuciosa exploración de los neonatos, para valorar su vitalidad y la presencia/ausencia de patologías.

### 3.2.11. Análisis estadístico

Todas las medias se expresan como medias  $\pm$  error estándar de la muestra. Las variables cualitativas se compararon utilizando el método de Chi-cuadrado, aplicando si era preciso la corrección de Yates o el test exacto de Fischer. Las variables cuantitativas (de tipo continuo), se analizaron mediante la comparación de medias  $t$  de Student.

## 4. RESULTADOS

## 4. RESULTADOS

### 4.1. CALIDAD SEMINAL IN VITRO

#### 4.1.1. Características del semen fresco previo a las congelaciones

Durante el periodo comprendido desde el 1 de diciembre de 2003 hasta el 4 de marzo de 2004, se realizaron 15 congelaciones a un total de 8 ejemplares. La Tabla 4.1 muestra el número de eyaculados que se utilizaron de cada perro hasta obtener un total de 80 pajuelas por método de congelación (160 pajuelas/animal). El número de eyaculados recogidos por animal se situó mayoritariamente entre 5 y 6, y solamente uno de los machos utilizados (perro 2) en esta experiencia aportaba un número menor de muestras seminales. La Tabla 4.1 muestra detalladamente los valores medios de los diferentes parámetros obtenidos en el semen en fresco durante el periodo de recogida.

Del total de eyaculados recogidos, el valor medio ( $\pm$  SEM) del volumen osciló entre  $0.95 \pm 0.1$  y  $3.8 \pm 0.6$  mL. Se observó una enorme variabilidad individual en cuanto al volumen aportado en cada eyaculado entre los machos. Dentro de cada perro, el volumen eyaculado se mantenía bastante homogéneo.

En referencia a la motilidad individual progresiva observada en cada eyaculado, los valores medios individuales oscilaron entre un 85.0 y un 92.5%. Con referencia a este parámetro, comprobamos que existía escasa variación individual entre ejemplares ( $p > 0.1$ ), manteniéndose este valor siempre por encima del 85%, mientras que dentro del mismo individuo, los valores obtenidos en los diferentes eyaculados eran prácticamente similares.

Con respecto al porcentaje de espermatozoides vivos, los valores fueron compatibles a los de la motilidad, siendo el rango de valores medios ( $\pm$  SEM) individuales entre un  $85.8 \pm 2.2$  y  $94.0 \pm 0.8\%$ . En general, existía una ligera variabilidad (no significativa;  $p > 0.1$ ) entre los machos; asimismo, dentro de cada individuo se observó que los valores más bajos se presentaron en las primeras recogidas, obteniéndose valores más altos en la segunda o tercera toma de muestras, para luego mantenerse constante.

La concentración media de espermatozoides/mL presente en los eyaculados empleados fue de  $711.22 \times 10^6$  esp/mL. Este parámetro presentó notables variaciones entre machos,



oscilando los valores entre  $529.6 \pm 105.7$  y  $1156.00 \pm 427.7$  ( $\times 10^6$  esp/mL). Además, dentro de cada macho, también se observaron enormes variaciones entre uno u otro día de recogida, si bien, como norma general, los valores más altos se presentaron en las primeras extracciones. Asimismo, se determinó la concentración total de espermatozoides presentes en cada eyaculado, obteniéndose en todos los casos valores medios superiores a  $1000 \times 10^6$  espermatozoides, oscilando el rango de concentración total entre  $1065.0 \pm 499.0$  y  $2644.1 \pm 621.8 \times 10^6$  espermatozoides. A pesar de que existían variaciones individuales, no se detectaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en este parámetro.

Finalmente, se determinaron los porcentajes de morfoanomalías y acrosomías en el semen fresco. Con referencia a las morfoanomalías, el porcentaje se situó siempre por debajo del 20%, observándose valores medios ( $\pm$  SEM) comprendidos entre  $6.7 \pm 1.8$  y  $12.0 \pm 2.1\%$  (rango individual: 4-18%). Al comparar los ejemplares entre sí, se detectaron diferencias tendentes ( $p < 0.09$ ) a la significación entre ejemplares (machos 5 y 7), si bien mayoritariamente el resto de individuos presentó una serie de valores similares. Asimismo, los valores de acrosomías presentes en las muestras valoradas, nunca se situaron por encima del 10%, detectándose valores medios entre un  $4.0 \pm 0.7$  y un  $6.8 \pm 0.8\%$  (rango individual: 2-9%), sin presentarse diferencias significativas entre los diferentes ejemplares.

Al utilizar eyaculados de forma individual, existían diferentes valores de volumen, motilidad, vitalidad, morfoanomalías y acrosomías entre ejemplares; no obstante, todas las muestras seminales en fresco, presentaron características seminales óptimas para someterse a los procedimientos de dilución y conservación.

Tabla 4.1. Características seminales en fresco (media  $\pm$  SEM) de los perros utilizados en la experiencia (entre paréntesis número de eyaculados de cada ejemplar)

	Volumen (mL)	Motilidad Individual (%)	Vitalidad (%)	Concentración/mL ( $\times 10^6$ )	Concentración total ( $\times 10^6$ )	Morfoanomalías (%)	Acrosomías (%)
Perro 1 (n=6)	1.72 $\pm$ 0.1	85.0 $\pm$ 1.8	86.5 $\pm$ 3.1	697.4 $\pm$ 115.4	1189.7 $\pm$ 166.4	9.8 $\pm$ 1.7	4.3 $\pm$ 0.4
Perro 2 (n=3)	3.80 $\pm$ 0.6	87.5 $\pm$ 2.0	88.6 $\pm$ 5.5	684.5 $\pm$ 243.8	2644.1 $\pm$ 621.8	10.0 $\pm$ 0.7	4.0 $\pm$ 0.7
Perro 3 (n=5)	0.95 $\pm$ 0.1	92.5 $\pm$ 1.5	94.0 $\pm$ 0.8	1156.0 $\pm$ 427.7	1065.0 $\pm$ 499.0	7.0 $\pm$ 2.8	4.0 $\pm$ 1.0
Perro 4 (n=6)	2.13 $\pm$ 0.4	87.8 $\pm$ 2.2	88.7 $\pm$ 2.9	595.4 $\pm$ 84.1	1220.7 $\pm$ 209.4	8.5 $\pm$ 1.0	4.5 $\pm$ 0.7
Perro 5 (n=5)	3.37 $\pm$ 0.6	91.7 $\pm$ 1.0	93.5 $\pm$ 0.6	626.4 $\pm$ 124.5	1984.5 $\pm$ 262.4	6.7 $\pm$ 1.8	5.2 $\pm$ 1.0
Perro 6 (n=6)	2.35 $\pm$ 0.5	88.9 $\pm$ 0.5	91.5 $\pm$ 1.8	756.1 $\pm$ 211.0	1548.1 $\pm$ 198.8	7.7 $\pm$ 1.7	4.0 $\pm$ 0.9
Perro 7 (n=5)	3.48 $\pm$ 0.8	85.0 $\pm$ 1.1	85.8 $\pm$ 2.2	529.6 $\pm$ 105.7	1845.4 $\pm$ 302.3	12.0 $\pm$ 2.1	6.8 $\pm$ 0.8
Perro 8 (n=6)	2.46 $\pm$ 0.7	90.0 $\pm$ 0.0	92.8 $\pm$ 0.9	644.2 $\pm$ 96.2	1306.0 $\pm$ 161.6	7.8 $\pm$ 0.6	4.6 $\pm$ 1.0

#### 4.1.2. Calidad seminal post-descongelación a lo largo del periodo experimental

##### 4.1.2.1. Motilidad espermática post-descongelación en los diferentes procedimientos de crioconservación

En las tablas 4.2 a 4.9, se muestran los valores medios de motilidad individual progresiva, obtenidos tras la descongelación en los diferentes métodos de congelación y para cada perro.

Con respecto al perro 1 (tabla 4.2), cuando se valora cada protocolo de congelación por separado a lo largo del tiempo, se observa que el valor medio de motilidad permanece relativamente constante hasta el día 180, no obstante, al valorar el día 365, se observan valores significativamente más bajos ( $p < 0.01$ ) con respecto al resto de días valorados. Cuando se valoran los protocolos de congelación entre sí, no se obtienen diferencias significativas durante los primeros 180 días, independientemente del porcentaje final de glicerol y del método de congelación empleado; sin embargo, el día 365 se observó un detrimento significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) del porcentaje de motilidad en las muestras congeladas en ultracongeladores de  $-152\text{ }^{\circ}\text{C}$  (ULF) frente al método tradicional con nitrógeno líquido (NL), independientemente del porcentaje de glicerol final empleado en los diluyentes.

En el perro 2 (tabla 4.3), los valores medios de motilidad se mantuvieron relativamente estables hasta el día 90, independientemente del método de congelación empleado y del porcentaje de glicerol. A partir del 180, al valorar cada protocolo de congelación por separado, se muestran valores significativamente más bajos ( $p < 0.01$ ) en ambos procedimientos, siendo más evidente en las muestras congeladas con un 5% de glicerol. Cuando se comparan los protocolos de congelación entre sí, en las pajuelas congeladas con mayor concentración de glicerol, el porcentaje de motilidad era significativamente mayor en las muestras que presentaban un 5% de glicerol (día 180,  $p < 0.05$ ; día 365,  $p < 0.01$ ).

El perro 3 (tabla 4.4) fue el único animal del que no se obtuvieron 160 pajuelas sino sólo 110 (78 pajuelas con glicerol al 6%, 32 pajuelas con glicerol al 5%). Se observó que en las dosis seminales que presentaban un 6% de glicerol final, los valores medios de motilidad se mantuvieron constantes a lo largo de todo el periodo experimental, siempre con valores medios superiores al 60%. En las pajuelas con glicerol al 5%, los valores de motilidad en los días 180 y 365 se mantuvieron constantes, también siempre por encima del 60%. No se observaron diferencias significativas entre protocolos de congelación, ni variaciones en los periodos testados ( $p > 0.1$ ).

Tabla 4.2. Motilidad individual post-descongelación en el perro 1 a lo largo del periodo experimental (media  $\pm$  SEM)

	Glicerol al 5%		Glicerol al 6%	
	NL	ULF	NL	ULF
Día 1	53.1 <sup>a</sup> $\pm$ 5.1	61.2 <sup>a</sup> $\pm$ 4.9	65.0 <sup>a</sup> $\pm$ 3.5	63.3 <sup>a</sup> $\pm$ 2.0
Día 30	58.7 <sup>a</sup> $\pm$ 5.6	62.0 <sup>a</sup> $\pm$ 3.7	57.5 <sup>a</sup> $\pm$ 3.7	64.5 <sup>a</sup> $\pm$ 2.6
Día 90	54.6 <sup>a</sup> $\pm$ 3.1	57.5 <sup>a</sup> $\pm$ 2.3	58.1 <sup>a</sup> $\pm$ 5.0	61.1 <sup>a</sup> $\pm$ 2.9
Día 180	60.0 <sup>a</sup> $\pm$ 3.5	55.0 <sup>a</sup> $\pm$ 4.9	60.0 <sup>a</sup> $\pm$ 3.5	55.0 <sup>a</sup> $\pm$ 3.5
Día 365	21.2 <sup>b,1</sup> $\pm$ 5.3	8.1 <sup>b,2</sup> $\pm$ 3.6	21.2 <sup>b,1</sup> $\pm$ 2.2	6.6 <sup>b,2</sup> $\pm$ 2.7

<sup>a,b</sup>: Diferentes letras en una misma columna representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

<sup>1,2</sup>: Diferentes números en una misma fila representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

Tabla 4.3. Motilidad individual post-descongelación en el perro 2 a lo largo del periodo experimental (media  $\pm$  SEM)

	Glicerol al 5%		Glicerol al 6%	
	NL	ULF	NL	ULF
Día 1	51.7 <sup>a</sup> $\pm$ 5.4	56.4 <sup>a</sup> $\pm$ 6.3	61.2 <sup>a</sup> $\pm$ 4.4	62.7 <sup>a</sup> $\pm$ 4.2
Día 30	49.8 <sup>a</sup> $\pm$ 4.2	52.5 <sup>a</sup> $\pm$ 1.2	60.1 <sup>a</sup> $\pm$ 3.2	62.0 <sup>a</sup> $\pm$ 3.2
Día 90	46.9 <sup>a</sup> $\pm$ 2.0	48.1 <sup>a</sup> $\pm$ 2.8	57.4 <sup>a</sup> $\pm$ 1.8	55.5 <sup>a</sup> $\pm$ 3.1
Día 180	15.6 <sup>b,1</sup> $\pm$ 3.0	16.0 <sup>b,1</sup> $\pm$ 2.5	34.3 <sup>b,2</sup> $\pm$ 3.0	29.7 <sup>b,2</sup> $\pm$ 3.6
Día 365	10.6 <sup>b,1</sup> $\pm$ 2.5	8.0 <sup>b,1</sup> $\pm$ 0.8	31.5 <sup>b,2</sup> $\pm$ 3.0	22.3 <sup>b,2</sup> $\pm$ 3.5

<sup>a,b</sup>: Diferentes letras en una misma columna representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

<sup>1,2</sup>: Diferentes números en una misma fila representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

Tabla 4.4. Motilidad individual post-descongelación en el perro 3 a lo largo del periodo experimental (media  $\pm$  SEM)

	Glicerol al 5%		Glicerol al 6%	
	NL	ULF	NL	ULF
Día 1			71.2 $\pm$ 0.5	72.5 $\pm$ 3.5
Día 30			65.5 $\pm$ 3.5	68.7 $\pm$ 1.8
Día 90			66.2 $\pm$ 1.0	67.5 $\pm$ 2.8
Día 180	62.50 $\pm$ 1.7	63.75 $\pm$ 0.9	63.3 $\pm$ 1.8	65.0 $\pm$ 2.2
Día 365	60.00 $\pm$ 3.5	59.83 $\pm$ 2.0	61.8 $\pm$ 1.7	62.5 $\pm$ 1.2

Tabla 4.5. Motilidad individual post-descongelación en el perro 4 a lo largo del periodo experimental (media  $\pm$  SEM)

	Glicerol al 5%		Glicerol al 6%	
	NL	ULF	NL	ULF
Día 1	58.2 <sup>a</sup> $\pm$ 1.9	60.5 <sup>a</sup> $\pm$ 1.7	58.6 <sup>a</sup> $\pm$ 4.1	61.2 <sup>a</sup> $\pm$ 5.6
Día 30	48.6 <sup>a</sup> $\pm$ 4.0	54.7 <sup>a</sup> $\pm$ 9.3	52.0 <sup>a</sup> $\pm$ 3.1	55.6 <sup>a</sup> $\pm$ 7.1
Día 90	28.5 <sup>b,1</sup> $\pm$ 3.0	50.0 <sup>a,2</sup> $\pm$ 1.8	51.6 <sup>a,2</sup> $\pm$ 4.1	50.6 <sup>a,2</sup> $\pm$ 4.1
Día 180	29.2 <sup>b,1</sup> $\pm$ 1.4	50.2 <sup>a,2</sup> $\pm$ 0.7	52.6 <sup>a,2</sup> $\pm$ 1.7	58.7 <sup>a,2</sup> $\pm$ 1.8
Día 365	26.7 <sup>b</sup> $\pm$ 3.3	22.7 <sup>b</sup> $\pm$ 5.5	28.0 <sup>b</sup> $\pm$ 3.7	26.9 <sup>b</sup> $\pm$ 4.1

<sup>a,b</sup>: Diferentes letras en una misma columna representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

<sup>1,2</sup>: Diferentes números en una misma fila representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

El macho 4 (tabla 4.5) mostró valores similares de motilidad el día 1 post-congelación en todos los protocolos de congelación, oscilando los valores medios entre 50-65%. Sin embargo, a partir del día 30 se observó un ligero descenso en los valores de motilidad, que continuaba hasta los días 90 y 180, para sufrir un descenso significativo ( $p < 0.05$ ) el día 365 en todos los protocolos. Además, al comparar los distintos protocolos de congelación entre sí, apreciamos que en las muestras crioconservadas en NL y un 5% de glicerol se produjo un descenso significativo ( $p < 0.05$ ) entre 3 y 12 meses tras la congelación.

Con respecto al perro 5 (tabla 4.6), presentó valores similares entre los diferentes métodos de congelación, independientemente del porcentaje de glicerol final presente en la muestra. Asimismo, este animal mantuvo unos valores de motilidad medios constantes a lo largo de todo el periodo experimental, sin observarse diferencias significativas, si bien el día 365, y en los procedimientos que incluyeron glicerol al 5%, fue evidente un leve descenso (no significativo) de la motilidad individual.

En el perro 6 (tabla 4.7), se observa que los valores se mantuvieron también constantes a lo largo de todo el periodo experimental dentro de cada protocolo; sólo las muestras valoradas el día 365, y conservadas en ULF mostraron un descenso significativo ( $p < 0.01$ ) en el porcentaje de motilidad media. Asimismo, en este ejemplar se observaron valores más elevados de motilidad media, en las muestras que presentaban un 6% de glicerol final, que en aquellas congeladas utilizando un 5%, siendo las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), desde el día 30 en adelante.

Para el macho 7 (tabla 4.8), durante los primeros 90 días de congelación, los valores medios de motilidad fueron bastante similares en los dos métodos de congelación y con los dos diluyentes empleados. A partir del día 180, los valores de motilidad sufrieron un ligero detrimento en las muestras con un 5% de glicerol, que se hicieron netamente significativas ( $p < 0.01$ ) el día 365 post-congelación, para ambas técnicas de congelación (NL, ULF). Asimismo, las muestras crioconservadas (día 365) con menor concentración de glicerol, presentaron valores medios inferiores ( $p < 0.01$ ) a las observadas en los protocolos con mayor concentración de glicerol.

Por último, el perro 8 (tabla 4.9) mostraba valores muy similares de motilidad el día 1 post-congelación; a partir del día 30, los valores disminuyeron ligeramente en las muestras congeladas utilizando un 5% de glicerol final, mientras que las congeladas con un 6% mantuvieron valores de motilidad constantes. A partir de este día y hasta el día 365, los valores

de motilidad no sufrieron prácticamente ninguna modificación, aunque en general fueron más altos para aquellas muestras congeladas con un 6% de glicerol.

Tabla 4.6. Motilidad individual post-descongelación en el perro 5 a lo largo del periodo experimental (media  $\pm$  SEM)

	Glicerol al 5%		Glicerol al 6%	
	NL	ULF	NL	ULF
Día 1	62.8 $\pm$ 4.4	68.7 $\pm$ 1.4	70.0 $\pm$ 1.2	71.1 $\pm$ 1.8
Día 30	62.1 $\pm$ 4.1	63.1 $\pm$ 1.4	66.6 $\pm$ 1.8	64.4 $\pm$ 1.8
Día 90	60.1 $\pm$ 2.1	59.1 $\pm$ 1.0	64.0 $\pm$ 1.9	63.7 $\pm$ 2.8
Día 180	58.1 $\pm$ 2.5	58.7 $\pm$ 1.5	62.4 $\pm$ 1.8	62.5 $\pm$ 1.7
Día 365	53.8 $\pm$ 2.4	53.3 $\pm$ 2.5	61.7 $\pm$ 1.5	63.0 $\pm$ 1.4

Tabla 4.7. Motilidad individual post-descongelación en el perro 6 a lo largo del periodo experimental (media  $\pm$  SEM)

	Glicerol al 5%		Glicerol al 6%	
	NL	ULF	NL	ULF
Día 1	60.4 <sup>a</sup> $\pm$ 7.4	66.1 <sup>a</sup> $\pm$ 1.8	70.7 $\pm$ 3.0	68.0 <sup>a</sup> $\pm$ 1.7
Día 30	53.7 <sup>a,1</sup> $\pm$ 5.4	53.2 <sup>a,1</sup> $\pm$ 2.6	66.2 <sup>2</sup> $\pm$ 1.9	70.0 <sup>a,2</sup> $\pm$ 1.2
Día 90	49.6 <sup>ab,1</sup> $\pm$ 2.0	48.2 <sup>a,1</sup> $\pm$ 2.3	67.5 <sup>2</sup> $\pm$ 1.8	67.5 <sup>a,2</sup> $\pm$ 1.0
Día 180	43.9 <sup>b,1</sup> $\pm$ 3.8	47.0 <sup>a,1</sup> $\pm$ 3.4	68.7 <sup>2</sup> $\pm$ 1.9	66.2 <sup>a,2</sup> $\pm$ 1.4
Día 365	40.6 <sup>b,1</sup> $\pm$ 1.6	12.2 <sup>b,2</sup> $\pm$ 2.4	65.8 <sup>3</sup> $\pm$ 2.7	23.6 <sup>b,2</sup> $\pm$ 4.1

<sup>a,b</sup>: Diferentes letras en una misma columna representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

<sup>1,2,3</sup>: Diferentes números en una misma fila representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

Tabla 4.8. Motilidad individual post-descongelación en el perro 7 a lo largo del periodo experimental (media  $\pm$  SEM)

	Glicerol al 5%		Glicerol al 6%	
	NL	ULF	NL	ULF
Día 1	65.7 <sup>a</sup> $\pm$ 2.6	61.5 <sup>a</sup> $\pm$ 3.7	65.7 $\pm$ 1.4	68.6 $\pm$ 1.4
Día 30	66.0 <sup>a</sup> $\pm$ 1.4	66.1 <sup>a</sup> $\pm$ 1.9	60.0 $\pm$ 0.9	66.8 $\pm$ 3.2
Día 90	56.8 <sup>a</sup> $\pm$ 2.7	59.5 <sup>a</sup> $\pm$ 1.9	58.6 $\pm$ 2.5	62.0 $\pm$ 1.2
Día 180	37.5 <sup>b,1</sup> $\pm$ 3.1	54.0 <sup>a,2</sup> $\pm$ 2.0	60.7 <sup>2</sup> $\pm$ 2.8	63.4 <sup>2</sup> $\pm$ 2.2
Día 365	26.0 <sup>b,1</sup> $\pm$ 3.4	16.0 <sup>b,1</sup> $\pm$ 3.0	56.3 <sup>2</sup> $\pm$ 4.3	58.9 <sup>2</sup> $\pm$ 4.0

<sup>a,b</sup>: Diferentes letras en una misma columna representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

<sup>1,2</sup>: Diferentes números en una misma fila representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

Tabla 4.9. Motilidad individual post-descongelación en el perro 8 a lo largo del periodo experimental (media  $\pm$  SEM)

	Glicerol al 5%		Glicerol al 6%	
	NL	ULF	NL	ULF
Día 1	62.6 $\pm$ 3.6	61.7 $\pm$ 2.2	64.1 $\pm$ 6.0	65.0 $\pm$ 1.2
Día 30	57.5 $\pm$ 3.3	57.3 $\pm$ 4.5	63.6 $\pm$ 2.4	65.6 $\pm$ 1.9
Día 90	54.0 $\pm$ 2.6	51.1 $\pm$ 3.0	58.7 $\pm$ 1.7	58.1 $\pm$ 1.9
Día 180	53.7 $\pm$ 2.5	55.6 $\pm$ 2.8	59.4 $\pm$ 4.0	61.0 $\pm$ 3.6
Día 365	52.5 $\pm$ 2.0	51.2 $\pm$ 3.9	58.1 $\pm$ 3.2	58.5 $\pm$ 2.1

Al valorar el conjunto global de resultados, se puede observar que los machos se pueden agrupar en diferentes categorías: por un lado, los machos 3, 5 y 8 mostraron unos valores de motilidad prácticamente constantes a lo largo de todo el periodo experimental, con independencia del método de congelación empleado (NL *vs* ULF), si bien parece que los resultados eran ligeramente más elevados en aquellas pajuelas con un 6% de concentración final de glicerol. Otro grupo lo constituyen los perros 1 y 6 que presentaron valores de motilidad prácticamente similares a lo largo de todo el periodo experimental, salvo en la última valoración (día 365) donde era apreciable un descenso significativo de la motilidad espermática. Por último, los machos 2, 4 y 7 presentaron valores medios de motilidad bastante similares durante los primeros tres meses tras la congelación; sin embargo, a partir de los 6 meses y sobre todo tras 1 año de crioconservación, las evaluaciones mostraron resultados muy heterogéneos, con independencia del protocolo de congelación o la cantidad final de glicerol.

#### 4.1.2.2. Comparación de la motilidad individual progresiva entre los diferentes ejemplares a lo largo del periodo experimental

El primer día tras la descongelación (tabla 4.10), aunque los porcentajes medios de motilidad eran sensiblemente inferiores en algunos machos (perros 2 y 4) que en el resto, no se llegaron a detectar diferencias significativas entre los diferentes individuos; sólo en las muestras conservadas con un 6% de glicerol en NL, se observó que dos machos (perros 3 y 5) presentaron valores medios significativamente ( $p < 0.05$ ) superiores a los del perro 4.

Tabla 4.10. Motilidad individual post-descongelación tras 1 día de crioconservación en cada macho (media  $\pm$  SEM)

	Glicerol al 5%		Glicerol al 6%	
	NL	ULF	NL	ULF
Macho 1	53.1 $\pm$ 5.1	61.2 $\pm$ 4.9	65.0 <sup>ab</sup> $\pm$ 3.5	63.3 $\pm$ 2.0
Macho 2	51.7 $\pm$ 5.4	56.4 $\pm$ 6.3	61.2 <sup>ab</sup> $\pm$ 4.4	62.7 $\pm$ 4.2
Macho 3			71.2 <sup>a</sup> $\pm$ 0.5	72.5 $\pm$ 3.5
Macho 4	58.2 $\pm$ 1.9	60.5 $\pm$ 1.7	58.6 <sup>b</sup> $\pm$ 4.1	61.2 $\pm$ 5.6
Macho 5	62.8 $\pm$ 4.4	68.7 $\pm$ 1.4	70.0 <sup>a</sup> $\pm$ 1.2	71.1 $\pm$ 1.8
Macho 6	60.4 $\pm$ 7.4	66.1 $\pm$ 1.8	70.7 <sup>ab</sup> $\pm$ 3.0	68.0 $\pm$ 1.7
Macho 7	65.7 $\pm$ 2.6	61.5 $\pm$ 3.7	65.7 <sup>ab</sup> $\pm$ 1.4	68.6 $\pm$ 1.4
Macho 8	62.6 $\pm$ 3.6	61.7 $\pm$ 2.2	64.4 <sup>ab</sup> $\pm$ 6.0	65.0 $\pm$ 1.2

<sup>a,b</sup>: Diferentes letras en una misma columna representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

En las muestras valoradas 30 días tras la congelación (tabla 4.11), se observaba que existían importantes diferencias entre animales. Así, en las pajuelas con un 5% de glicerol, con independencia del protocolo de congelación empleado, se detectaban que dos machos (perros 2 y 4) presentaban unos valores medios de motilidad espermática inferior al resto de individuos, siendo significativo ( $p < 0.05$ ) con respecto a los machos 5 y 7. En las muestras con una mayor concentración de glicerol, el macho 4 seguía mostrando unos niveles medios significativamente inferiores ( $p < 0.05$ ) que la mayoría de ejemplares (machos 3, 5, 6 y 8).

Tabla 4.11. Motilidad individual post-descongelación tras 30 días de crioconservación en cada macho (media  $\pm$  SEM)

	Glicerol al 5%		Glicerol al 6%	
	NL	ULF	NL	ULF
Macho 1	58.7 <sup>ab</sup> $\pm$ 5.6	62.0 <sup>ab</sup> $\pm$ 3.7	57.5 <sup>ab</sup> $\pm$ 3.7	64.5 <sup>ab</sup> $\pm$ 2.6
Macho 2	49.8 <sup>b</sup> $\pm$ 4.2	52.5 <sup>b</sup> $\pm$ 1.2	60.1 <sup>ab</sup> $\pm$ 3.2	62.0 <sup>ab</sup> $\pm$ 5.4
Macho 3			65.5 <sup>a</sup> $\pm$ 3.5	68.7 <sup>a</sup> $\pm$ 1.8
Macho 4	48.6 <sup>b</sup> $\pm$ 4.0	54.7 <sup>b</sup> $\pm$ 3.3	52.0 <sup>b</sup> $\pm$ 3.1	55.6 <sup>b</sup> $\pm$ 4.1
Macho 5	62.1 <sup>a</sup> $\pm$ 4.1	63.1 <sup>a</sup> $\pm$ 1.4	66.6 <sup>a</sup> $\pm$ 1.8	64.4 <sup>ab</sup> $\pm$ 1.8
Macho 6	53.7 <sup>ab</sup> $\pm$ 5.4	53.2 <sup>b</sup> $\pm$ 2.6	66.2 <sup>a</sup> $\pm$ 1.9	70.0 <sup>a</sup> $\pm$ 1.2
Macho 7	66.0 <sup>a</sup> $\pm$ 1.4	66.1 <sup>a</sup> $\pm$ 1.9	60.0 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.9	66.8 <sup>ab</sup> $\pm$ 3.2
Macho 8	57.5 <sup>ab</sup> $\pm$ 3.3	57.3 <sup>ab</sup> $\pm$ 4.5	63.6 <sup>a</sup> $\pm$ 2.4	65.6 <sup>ab</sup> $\pm$ 1.9

a,b: Diferentes letras en una misma columna representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

Las muestras valoradas 3 meses tras el tratamiento de crioconservación (tabla 4.12) mostraron unos resultados muy parecidos a los observados al mes de congelación. En las muestras con menor concentración de glicerol, tanto en NL como en ULF, los machos 2 y 6 tenían valores significativamente más bajos ( $p < 0.05$ ) que los machos 5 y 7, mientras que el perro 4 (en NL) mostraba unos valores notablemente inferiores ( $p < 0.01$ ) que el resto de animales. En las muestras con glicerol al 6%, el macho 4 presentaba valores inferiores ( $p < 0.05$ ) a los observados en los machos 3, 5 y 6, con independencia del protocolo de congelación empleado.

Tabla 4.12. Motilidad individual post-descongelación tras 90 días de crioconservación en cada macho (media  $\pm$  SEM)

	Glicerol al 5%		Glicerol al 6%	
	NL	ULF	NL	ULF
Macho 1	54.6 <sup>ab</sup> $\pm$ 3.1	57.5 <sup>ab</sup> $\pm$ 2.3	58.1 <sup>ab</sup> $\pm$ 5.0	61.1 <sup>a</sup> $\pm$ 2.9
Macho 2	46.9 <sup>b</sup> $\pm$ 2.2	48.1 <sup>b</sup> $\pm$ 2.8	57.4 <sup>ab</sup> $\pm$ 1.8	55.5 <sup>ab</sup> $\pm$ 3.1
Macho 3			66.2 <sup>a</sup> $\pm$ 1.0	67.5 <sup>a</sup> $\pm$ 2.8
Macho 4	28.5 <sup>c</sup> $\pm$ 3.0	50.0 <sup>ab</sup> $\pm$ 1.8	51.6 <sup>b</sup> $\pm$ 4.1	50.6 <sup>b</sup> $\pm$ 3.1
Macho 5	60.1 <sup>a</sup> $\pm$ 2.1	59.1 <sup>a</sup> $\pm$ 1.0	64.0 <sup>a</sup> $\pm$ 1.8	63.7 <sup>a</sup> $\pm$ 2.8
Macho 6	49.6 <sup>b</sup> $\pm$ 2.0	48.2 <sup>b</sup> $\pm$ 2.3	67.5 <sup>a</sup> $\pm$ 1.9	67.5 <sup>a</sup> $\pm$ 1.0
Macho 7	58.8 <sup>a</sup> $\pm$ 2.7	59.5 <sup>a</sup> $\pm$ 1.9	58.6 <sup>ab</sup> $\pm$ 2.5	62.0 <sup>a</sup> $\pm$ 1.2
Macho 8	54.0 <sup>ab</sup> $\pm$ 2.6	51.1 <sup>ab</sup> $\pm$ 3.0	58.7 <sup>ab</sup> $\pm$ 1.7	58.1 <sup>ab</sup> $\pm$ 1.9

a,b,c: Diferentes letras en una misma columna representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ )



A los 6 meses de la crioconservación (tabla 4.13), los machos 1, 3, 5 y 8 mostraban unos porcentajes medios de motilidad espermática muy similares entre sí, sin detectarse diferencias significativas entre los animales ( $p > 0.1$ ). No obstante, el perro 2 mostró valores medios de motilidad progresiva ( $p < 0.01$ ) inferiores al resto de los machos, en los 4 procedimientos testados. Los machos 4, 6 y 7 presentaron unos valores medios inferiores ( $p < 0.01$ ) a los machos 1, 3 y 8 en las muestras congeladas con un 5% de glicerol y en NL, mientras que para el resto de protocolos, sólo el perro 4 (ULF-5% glicerol;  $p < 0.05$ ; NL-6% glicerol;  $p < 0.01$ ) y el perro 6 (ULF-5% glicerol,  $p < 0.05$ ) mostraron valores inferiores con respecto a alguno de los otros ejemplares.

Tabla 4.13. Motilidad individual post-descongelación tras 180 días de crioconservación en cada macho (media  $\pm$  SEM)

	Glicerol al 5%		Glicerol al 6%	
	NL	ULF	NL	ULF
Macho 1	60.0 <sup>a</sup> $\pm$ 3.0	55.0 <sup>ab</sup> $\pm$ 2.5	60.0 <sup>ab</sup> $\pm$ 3.5	55.0 <sup>a</sup> $\pm$ 1.9
Macho 2	15.6 <sup>b</sup> $\pm$ 4.1	16.0 <sup>c</sup> $\pm$ 1.8	34.3 <sup>c</sup> $\pm$ 3.0	29.7 <sup>b</sup> $\pm$ 1.7
Macho 3	62.5 <sup>a</sup> $\pm$ 1.7	63.75 <sup>a</sup> $\pm$ 0.9	63.5 <sup>a</sup> $\pm$ 1.8	65.0 <sup>a</sup> $\pm$ 2.2
Macho 4	29.2 <sup>c</sup> $\pm$ 1.4	50.2 <sup>b</sup> $\pm$ 0.7	52.6 <sup>b</sup> $\pm$ 1.7	58.7 <sup>a</sup> $\pm$ 1.8
Macho 5	58.1 <sup>a</sup> $\pm$ 2.5	58.7 <sup>ab</sup> $\pm$ 1.5	62.4 <sup>ab</sup> $\pm$ 1.8	62.5 <sup>a</sup> $\pm$ 1.7
Macho 6	43.9 <sup>d</sup> $\pm$ 3.8	47.0 <sup>b</sup> $\pm$ 3.4	68.7 <sup>a</sup> $\pm$ 1.9	66.2 <sup>a</sup> $\pm$ 1.4
Macho 7	37.5 <sup>cd</sup> $\pm$ 3.1	54.0 <sup>ab</sup> $\pm$ 2.0	60.7 <sup>ab</sup> $\pm$ 2.8	63.4 <sup>a</sup> $\pm$ 2.2
Macho 8	53.7 <sup>a</sup> $\pm$ 2.5	55.6 <sup>ab</sup> $\pm$ 2.8	59.4 <sup>ab</sup> $\pm$ 4.0	61.0 <sup>a</sup> $\pm$ 3.6

<sup>a,b,c,d</sup>: Diferentes letras en una misma columna representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

Finalmente, 1 año tras su congelación (tabla 4.14), los machos 3, 5 y 8 presentaron valores medios de motilidad espermática muy similares entre sí, en cada uno de los protocolos de congelación empleados. Asimismo, estos animales presentaron un mayor porcentaje ( $p < 0.01$ ) de espermatozoides con movilidad progresiva que los machos 1, 2 y 4 en todos los procedimientos testados. Los perros 6 y 7 presentaron unos valores inferiores a los machos 3, 5 y 8 en las muestras conservadas con glicerol al 5% (tanto en NL como en ULF), mientras que no se detectaron prácticamente diferencias cuando estos ejemplares se compararon entre sí, al valorar las muestras crioconservadas con mayor concentración de glicerol.

Tabla 4.14. Motilidad individual post-descongelación tras 365 días de crioconservación en cada macho (media  $\pm$  SEM)

	Glicerol al 5%		Glicerol al 6%	
	NL	ULF	NL	ULF
Macho 1	21.2 <sup>ab</sup> $\pm$ 5.3	8.1 <sup>a</sup> $\pm$ 3.6	21.2 <sup>a</sup> $\pm$ 2.2	6.6 <sup>a</sup> $\pm$ 2.7
Macho 2	10.6 <sup>a</sup> $\pm$ 2.5	8.0 <sup>a</sup> $\pm$ 0.8	37.5 <sup>b</sup> $\pm$ 3.0	22.3 <sup>b</sup> $\pm$ 3.5
Macho 3	60.0 <sup>c</sup> $\pm$ 3.5	59.8 <sup>c</sup> $\pm$ 2.0	61.8 <sup>c</sup> $\pm$ 1.7	62.5 <sup>c</sup> $\pm$ 1.2
Macho 4	26.7 <sup>b</sup> $\pm$ 3.3	22.7 <sup>b</sup> $\pm$ 5.5	28.0 <sup>ab</sup> $\pm$ 3.7	26.9 <sup>b</sup> $\pm$ 4.1
Macho 5	53.8 <sup>cd</sup> $\pm$ 2.4	53.3 <sup>c</sup> $\pm$ 2.5z	61.7 <sup>c</sup> $\pm$ 1.5	63.0 <sup>c</sup> $\pm$ 1.4
Macho 6	40.6 <sup>d</sup> $\pm$ 1.6	12.2 <sup>ab</sup> $\pm$ 2.4	65.8 <sup>c</sup> $\pm$ 2.7	23.6 <sup>b</sup> $\pm$ 4.1
Macho 7	26.0 <sup>ab</sup> $\pm$ 3.4	16.0 <sup>ab</sup> $\pm$ 3.0	59.4 <sup>c</sup> $\pm$ 4.3	56.3 <sup>c</sup> $\pm$ 4.0
Macho 8	52.5 <sup>cd</sup> $\pm$ 2.0	51.2 <sup>c</sup> $\pm$ 3.5	58.1 <sup>c</sup> $\pm$ 3.2	58.5 <sup>c</sup> $\pm$ 2.1

a,b,c,d: Diferentes letras en una misma columna representan diferencias significativas: ( $p < 0.05$ )

Los resultados mostraron que tres ejemplares (3, 5 y 8) mostraban valores muy similares a lo largo de todo el periodo experimental, con total independencia del protocolo de congelación empleado. Por otro lado, las diferencias entre individuos en la motilidad espermática, comenzaron a manifestarse muy levemente entre 1 y 3 meses tras la congelación, para mostrarse muy evidentes cuando las muestras fueron evaluadas tras un periodo de crioconservación de 6 a 12 meses. Asimismo, aquellos machos que desde el principio mostraban peores porcentajes de motilidad espermática (perros 2 y 4), conforme avanzaba el periodo de conservación, se mantenía esta disminución de la calidad espermática o incluso se incrementaba, sobre todo en las muestras conservadas con una menor concentración de glicerol.

#### 4.1.2.3. Progresión de la motilidad espermática post-descongelación a lo largo del tiempo

En el perro 1 (Figuras 4.1 a 4.4), en las muestras conservadas durante los primeros 6 meses, se observó una progresiva disminución de la motilidad espermática en las primeras 2 horas tras la descongelación, independientemente de la concentración de glicerol o del procedimiento de congelación empleado. Asimismo, a las 4 horas post-descongelación se detectó una brusca caída por debajo del 30% en todas las muestras, con independencia del procedimiento de congelación o la concentración de glicerol; finalmente, 6 horas tras la descongelación, la totalidad de las muestras valoradas presentaban valores inferiores al 20% de motilidad espermática. Por otro lado, las muestras valoradas tras 365 días de crioconservación mostraron valores muy bajos desde el inicio, de tal forma que entre 2 y 4 horas post-descongelación, la motilidad espermática era indetectable en la totalidad de las pajuelas.

El perro 2 (Figuras 4.5 a 4.8), en las muestras congeladas con glicerol al 5% (NL y ULF), se detectó un brusco descenso a partir de la primera hora tras la descongelación, hasta alcanzar valores inferiores al 5%, a las 4 horas post-descongelación. Las muestras con un 6% de glicerol presentaron una dinámica de motilidad muy parecida durante los primeros 3 meses de crioconservación, con valores entre un 40-60%, para posteriormente mostrar un suave descenso hasta las 6 horas post-descongelación; tras 6-12 meses de congelación, las muestras evaluadas presentaron niveles medios inferiores al 20%, si bien se partían de motilidades medias del 35%, inmediatamente tras la descongelación. En este animal se observaron diferencias significativas en función de la concentración de glicerol: las pajuelas conservadas durante 3 meses presentaron valores significativamente más elevados de motilidad ( $p < 0.01$ ), a partir de las 2 horas post-descongelación, en aquellas muestras con una mayor concentración de glicerol, que en las muestras con menor concentración, con independencia del método de congelación.

En el macho 3 (Figuras 4.9 a 4.12), de las dosis congeladas con un 5% de glicerol, sólo se testaron las muestras conservadas durante 6 y 12 meses. El patrón de motilidad espermática en ambos procedimientos fue prácticamente similar: niveles elevados (>55%) inmediatamente tras la descongelación, que se mantuvieron prácticamente constantes durante las primeras 2 horas, para mostrar un descenso a las 4-6 horas post-descongelación, algo más marcado en las muestras conservadas en NL. Las pajuelas congeladas con glicerol al 6%, presentaron unos valores de motilidad espermática relativamente altos (55-70%) durante las dos primeras horas tras la descongelación, tanto en NL como en el ULF. Cuatro horas post-descongelación, los niveles fueron más dispersos en ambos procedimientos, con valores elevados en algunos

periodos concretos (55%, día 30, NL), si bien mayoritariamente mostraban un descenso, que se evidenciaba 6 horas post-descongelación en la casi totalidad de los días testados.

En el perro 4 (Figuras 4.13 a 4.16), las muestras congeladas con un 5% de glicerol presentaron un modelo muy similar en ambos protocolos de congelación. En las valoraciones realizadas sobre muestras descongeladas entre los días 1 y 180 de crioconservación, durante las primeras 4 horas post-descongelación, se observaba un progresivo descenso de la motilidad espermática, si bien fue menos uniforme en las muestras congeladas con ULF. Las muestras valoradas tras 365 días de congelación, presentaron unos valores inferiores al 30% inmediatamente tras su descongelación, disminuyendo drásticamente a partir de ese momento. Las muestras crioconservadas con glicerol al 6% mostraron una dinámica muy parecida en ambos protocolos. Durante las primeras horas post-descongelación, la motilidad se modificó muy ligeramente en cada uno de los periodos valorados (días 1-180 de conservación), para posteriormente sufrir un descenso más manifiesto entre las 4-6 horas post-descongelación.

Con respecto al perro 5 (Figuras 4.17 a 4.20), la motilidad espermática presentó una dinámica prácticamente similar, independientemente de la concentración final del glicerol o del procedimiento técnico de congelación y conservación utilizado. Así, la motilidad espermática apenas presentó variaciones durante las primeras dos horas post-descongelación, presentando valores similares tanto en NL como en ULF. Sin embargo, 4 horas tras la descongelación ya se observaba un descenso en el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva, siendo este descenso notablemente marcado a las 6 horas post-descongelación, si bien en días concretos (día 365; NL, glicerol al 6%), el porcentaje de motilidad se situaba cercano al 40%.

En el perro 6 (4.21 a 4.24), se observaron diferencias notables en el patrón de motilidad espermática entre los dos protocolos de congelación. Las muestras conservadas en NL (5% glicerol) presentaron unos valores medios inferiores al 50% inmediatamente tras la descongelación, para posteriormente mostrar una brusca caída, ya evidente 1 hora después. Por otro lado, en las muestras congeladas mediante ULF (5% glicerol), salvo las valoradas tras 1 año de conservación (donde desde el primer momento la motilidad espermática era deficiente), se comprobó que si bien existía también un descenso de la motilidad espermática post-descongelación conforme transcurría el tiempo, este descenso no fue tan manifiesto como en el caso del NL. Con respecto a las muestras conservadas con glicerol al 6%, la dinámica del movimiento espermático fue bastante similar entre ambas técnicas: durante las dos primeras

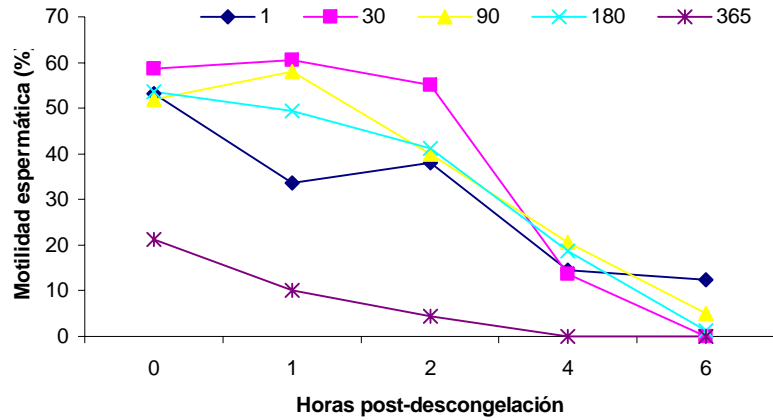
horas post-descongelación, los niveles de motilidad progresiva se mantuvieron entre un 40-65%, para sufrir una ligera caída, 4 horas tras la descongelación. Se detectó que las muestras conservadas con glicerol al 6% (días 30-180) presentaron valores significativamente más elevados ( $p < 0.05$ ) de motilidad, que las muestras conservadas con menor concentración de glicerol, a partir de la primera hora post-descongelación.

Las muestras congeladas del perro 7 (Figuras 4.25 a 4.28) mostraron una dinámica de motilidad espermática muy parecida durante los primeros seis meses de crioconservación, con independencia de la concentración de glicerol o la técnica de congelación. En las primeras dos horas post-descongelación, la mayor parte de los valores medios se situaron entre un 40-60%; a partir de este momento, se detectaba una caída manifiesta en aquellas muestras con un 5% de glicerol y un descenso bastante atenuado en las muestras con un 6% de glicerol; finalmente, 6 horas tras la descongelación, las muestras con mayor concentración de glicerol presentaban valores significativamente más elevados ( $p < 0.01$ ) que las dosis con menor concentración de glicerol. Asimismo, en las muestras valoradas tras 365 días de conservación, se detectaron diferencias significativas ( $p < 0.01$ ), puesto que aquellas dosis con un 5% de glicerol, mostraron valores notablemente inferiores durante las 6 horas post-descongelación que las muestras con un 6% de glicerol, con independencia de la técnica de congelación empleada.

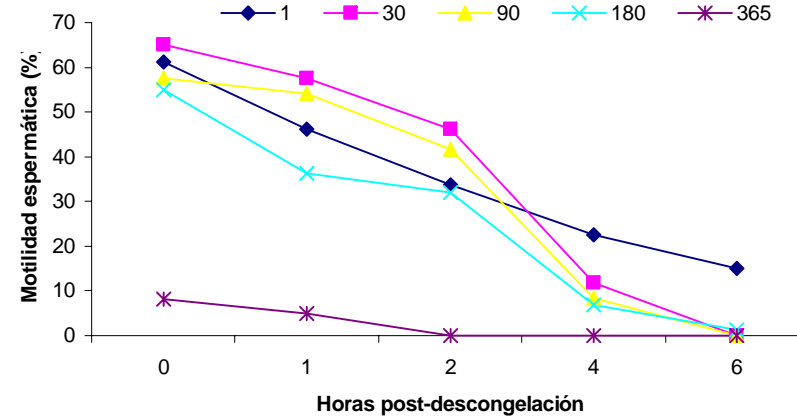
Las muestras congeladas y conservadas en NL del perro 8 (Figuras 4.29 a 4.32) manifestaron una dinámica de motilidad espermática muy parecida, independientemente de la concentración de glicerol en el diluyente. Durante las primeras dos horas post-descongelación, la motilidad espermática no se modificaba, y sólo se perdía esa uniformidad en periodos concretos (día 30, glicerol al 5%); a las 4 horas post-descongelación se evidenciaba una ligera disminución de la motilidad espermática, tanto en las muestras con glicerol al 5% (rango: 21-48%), como en aquellas con glicerol al 6% (rango: 20-32%). Seis horas tras la descongelación, la mayor parte de las pajuelas valoradas presentaron valores de motilidad inferiores al 15%. En las pajuelas congeladas y conservadas mediante ULF, las muestras con un 5% de glicerol, presentaron un paulatino descenso en la motilidad espermática durante las primeras 4 horas post-descongelación, para posteriormente sufrir una drástica caída hasta valores casi indetectables. Una dinámica similar fue observada en las muestras con un 6% de glicerol, si bien en este caso, 6 horas tras la descongelación, los porcentajes de motilidad mostraron valores superiores al 40%, en los días 1, 30 y 90 de conservación.

## PERRO 1

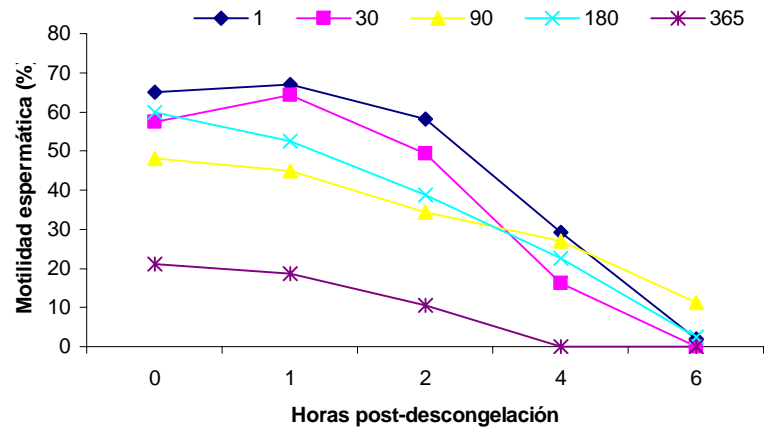
**Figura 4.1.** Motilidad espermática post-descongelación a lo largo del periodo experimental. Muestras congeladas con glicerol al 5% en NL.



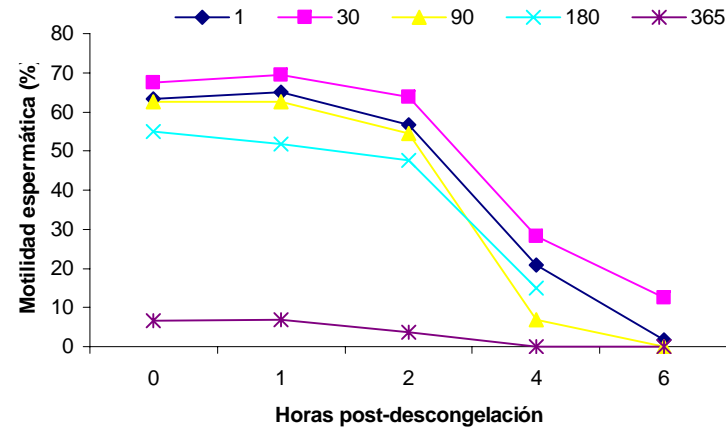
**Figura 4.2.** Motilidad espermática post-descongelación a lo largo del periodo experimental. Muestras congeladas con glicerol al 5% en ULF.



**Figura 4.3.** Motilidad espermática post-descongelación a lo largo del periodo experimental. Muestras congeladas con glicerol al 6% en NL.

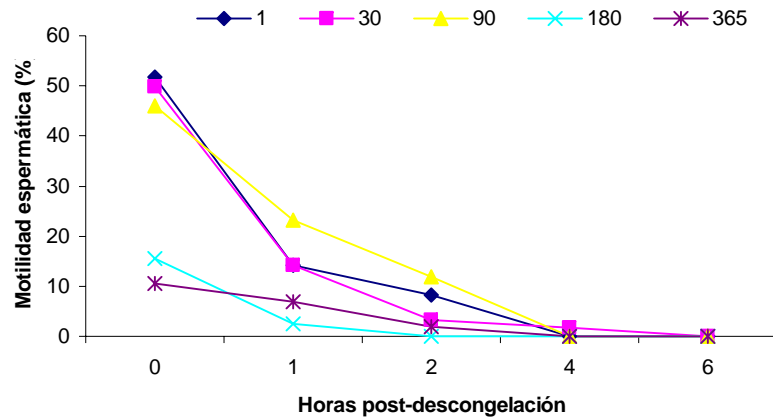


**Figura 4.4.** Motilidad espermática post-descongelación a lo largo del periodo experimental. Muestras congeladas con glicerol al 6% en ULF.

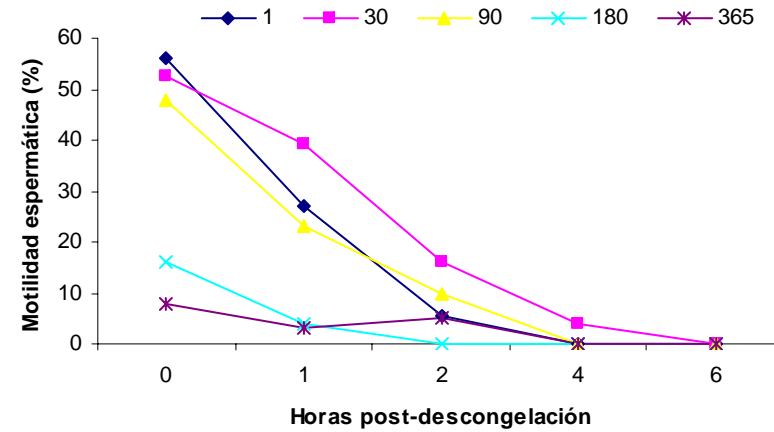


## PERRO 2

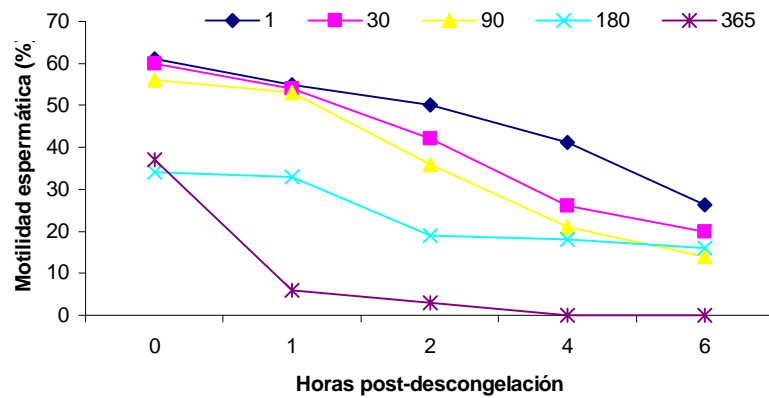
**Figura 4.5.** Motilidad espermática post-descongelación a lo largo del periodo experimental. Muestras congeladas con glicerol al 5% en NL.



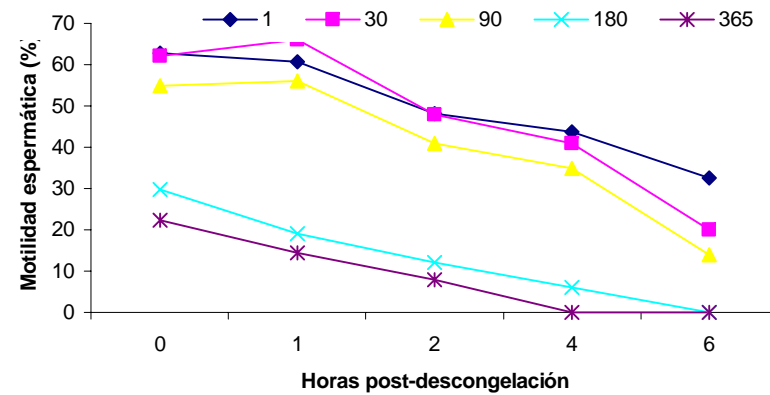
**Figura 4.6.** Motilidad espermática post-descongelación a lo largo del periodo experimental. Muestras congeladas con glicerol al 5% en ULF.



**Figura 4.7.** Motilidad espermática post-descongelación a lo largo del periodo experimental. Muestras congeladas con glicerol al 6% en NL.

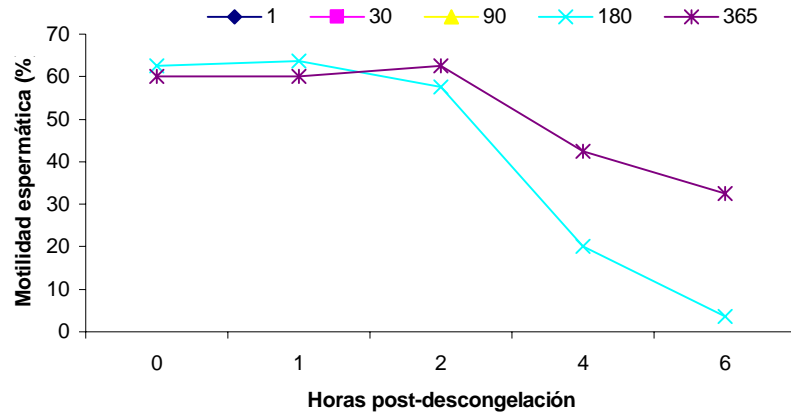


**Figura 4.8.** Motilidad espermática post-descongelación a lo largo del periodo experimental. Muestras congeladas con glicerol al 6% en ULF.

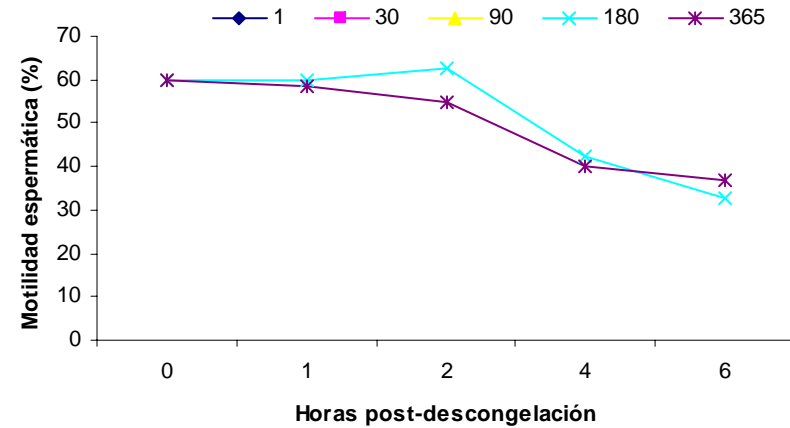


### PERRO 3

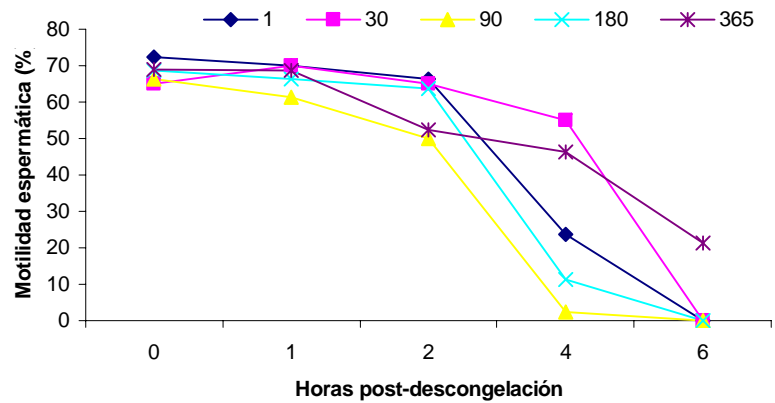
**Figura 4.9.** Motilidad espermática post-descongelación a lo largo del periodo experimental. Muestras congeladas con glicerol al 5% en NL.



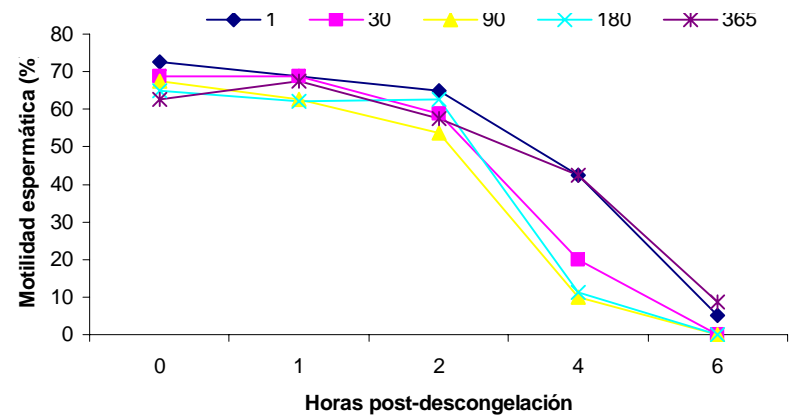
**Figura 4.10.** Motilidad espermática post-descongelación a lo largo del periodo experimental. Muestras congeladas con glicerol al 5% en ULF.



**Figura 4.11.** Motilidad espermática post-descongelación a lo largo del periodo experimental. Muestras congeladas con glicerol al 6% en NL.



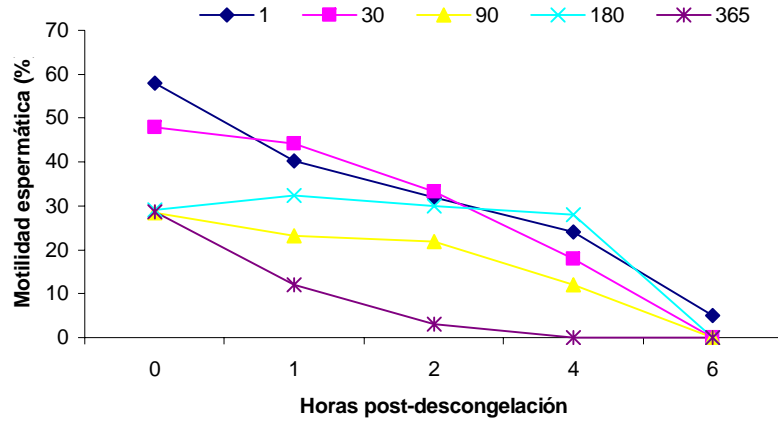
**Figura 4.12.** Motilidad espermática post-descongelación a lo largo del periodo experimental. Muestras congeladas con glicerol al 6% en ULF.



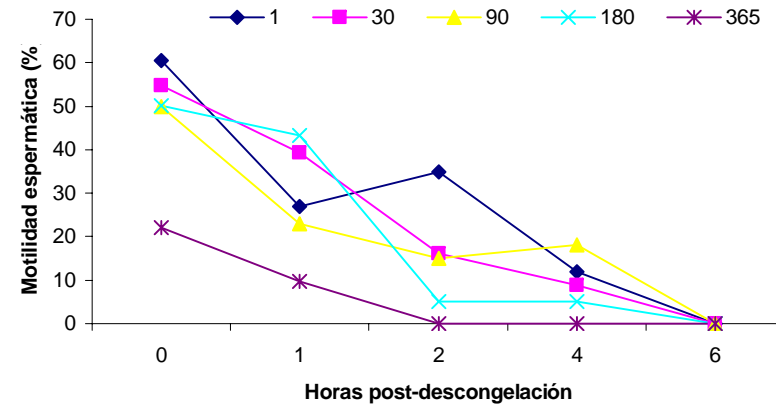


PERRO 4

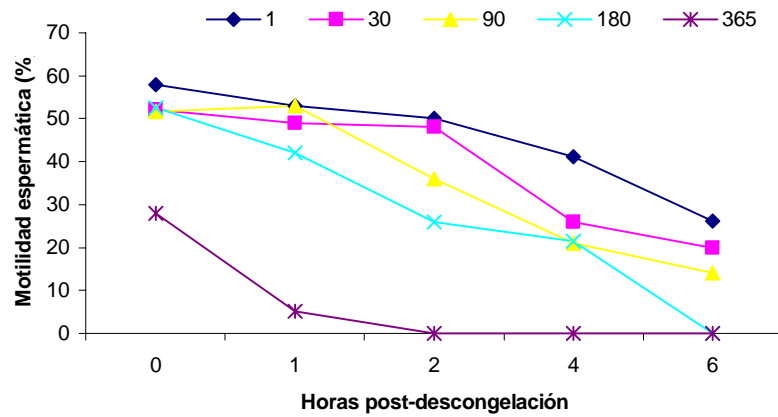
**Figura 4.13.** Motilidad espermática post-descongelación a lo largo del periodo experimental. Muestras congeladas con glicerol al 5% en NL.



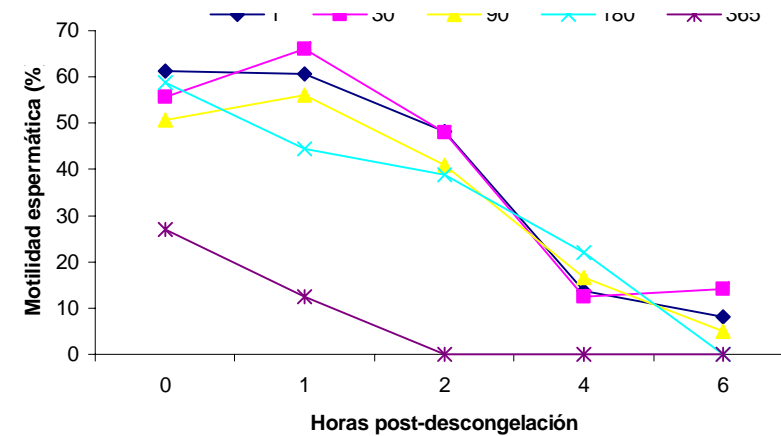
**Figura 4.14.** Motilidad espermática post-descongelación a lo largo del periodo experimental. Muestras congeladas con glicerol al 5% en ULF.



**Figura 4.15.** Motilidad espermática post-descongelación a lo largo del periodo experimental. Muestras congeladas con glicerol al 6% en NL.

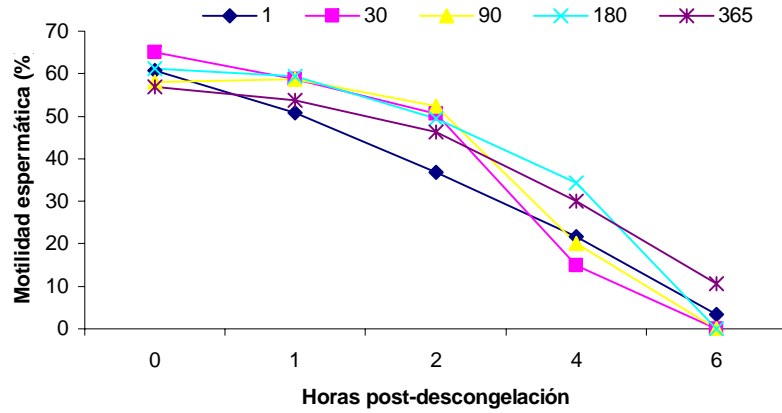


**Figura 4.16.** Motilidad espermática post-descongelación a lo largo del periodo experimental. Muestras congeladas con glicerol al 6% en ULF.

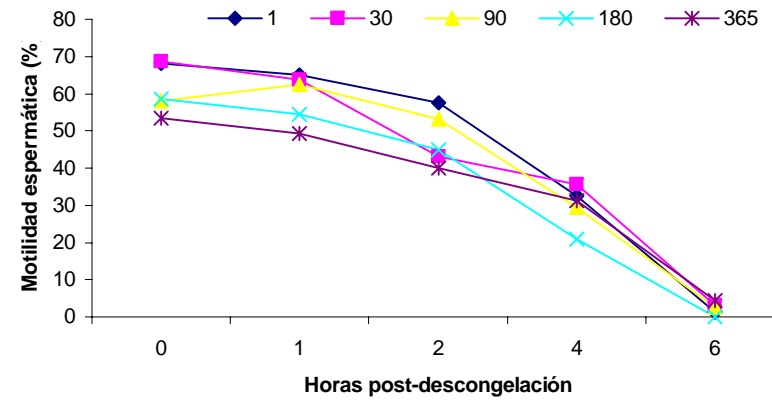


## PERRO 5

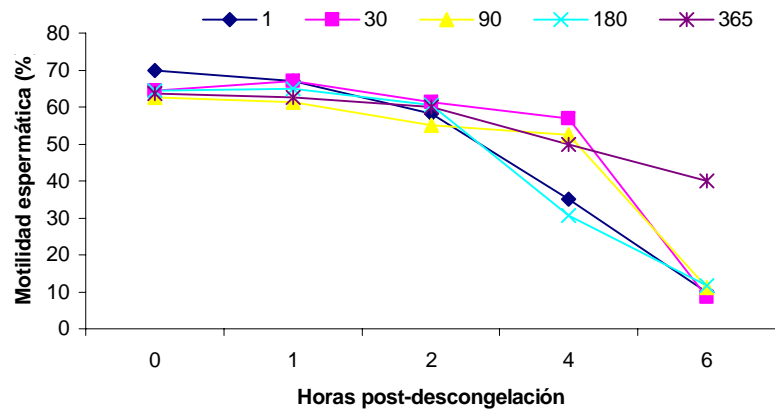
**Figura 4.17.** Motilidad espermática post-descongelación a lo largo del periodo experimental. Muestras congeladas con glicerol al 5% en NL.



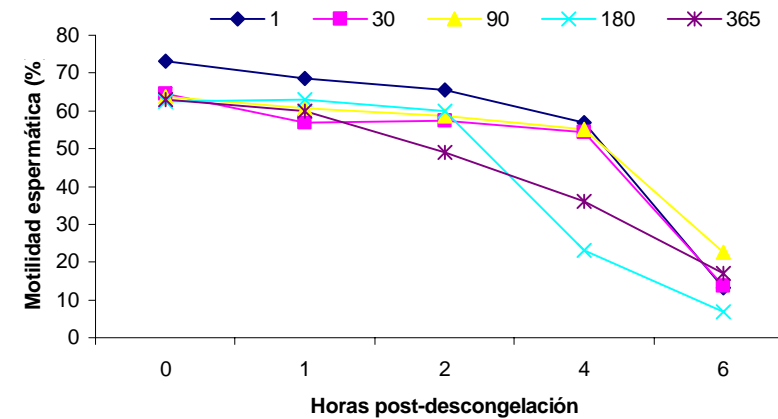
**Figura 4.18.** Motilidad espermática post-descongelación a lo largo del periodo experimental. Muestras congeladas con glicerol al 5% en ULF.



**Figura 4.19.** Motilidad espermática post-descongelación a lo largo del periodo experimental. Muestras congeladas con glicerol al 6% en NL.

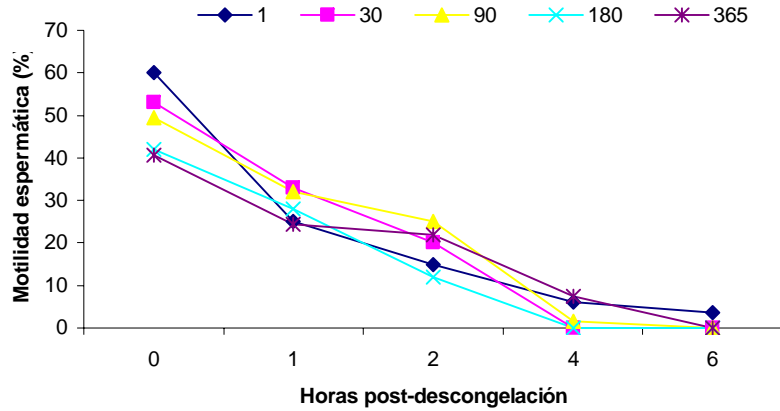


**Figura 4.20.** Motilidad espermática post-descongelación a lo largo del periodo experimental. Muestras congeladas con glicerol al 6% en ULF.

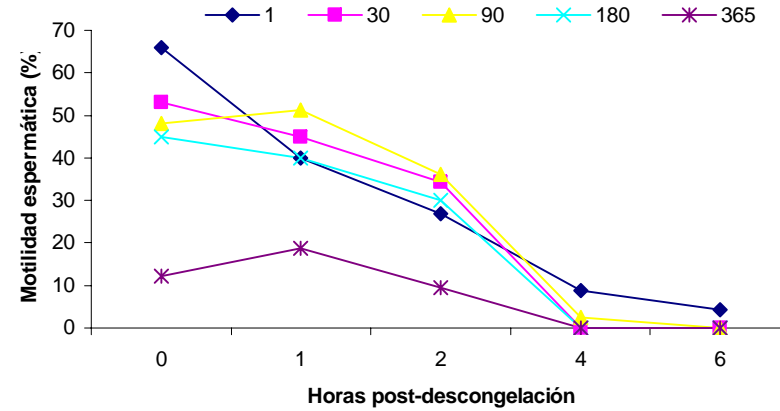


PERRO 6

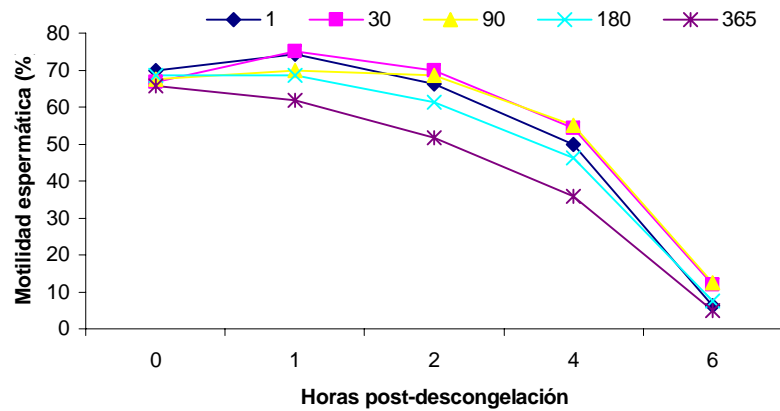
**Figura 4.21.** Motilidad espermática post-descongelación a lo largo del periodo experimental. Muestras congeladas con glicerol al 5% en NL.



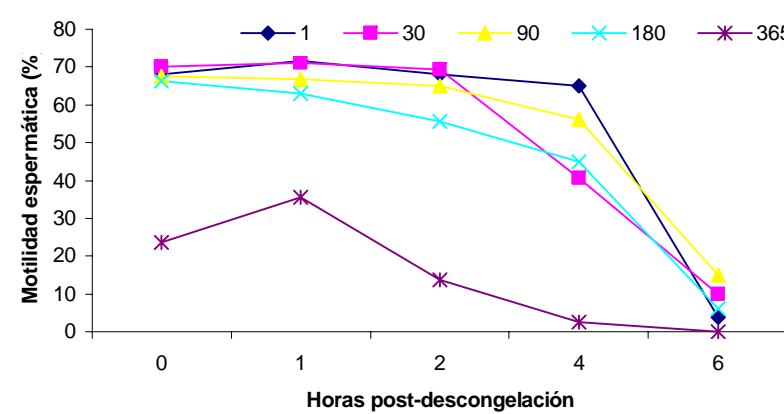
**Figura 4.22.** Motilidad espermática post-descongelación a lo largo del periodo experimental. Muestras congeladas con glicerol al 5% en ULF.



**Figura 4.23.** Motilidad espermática post-descongelación a lo largo del periodo experimental. Muestras congeladas con glicerol al 6% en NL.



**Figura 4.24.** Motilidad espermática post-descongelación a lo largo del periodo experimental. Muestras congeladas con glicerol al 6% en ULF.



PERRO 7

Figura 4.25. Motilidad espermática post-descongelación a lo largo del periodo experimental. Muestras congeladas con glicerol al 5% en NL.

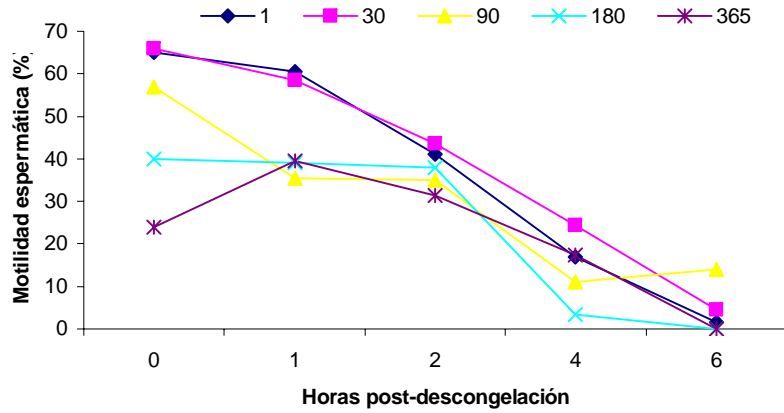


Figura 4.26. Motilidad espermática post-descongelación a lo largo del periodo experimental. Muestras congeladas con glicerol al 5% en ULF.

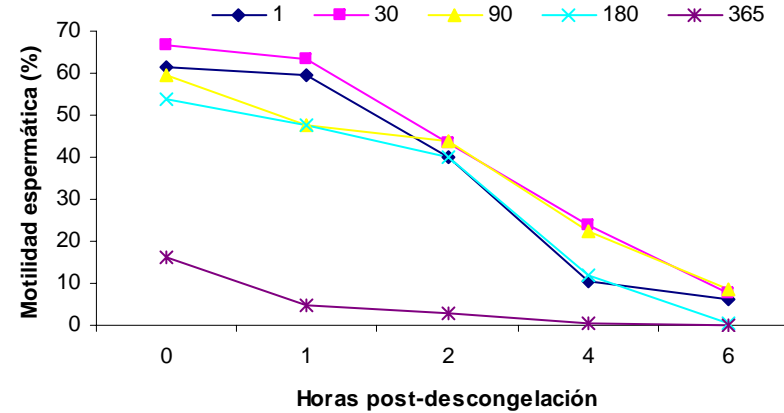


Figura 4.27. Motilidad espermática post-descongelación a lo largo del periodo experimental. Muestras congeladas con glicerol al 6% en NL.

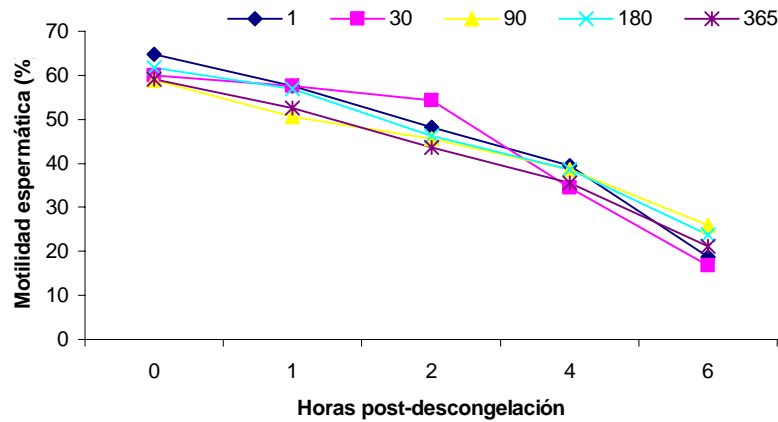
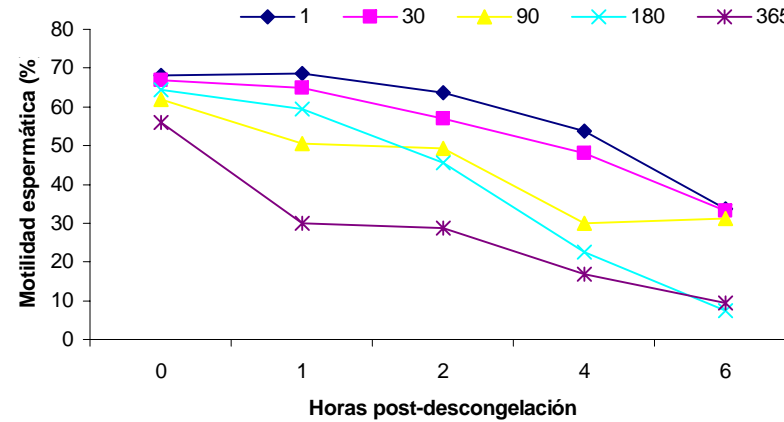
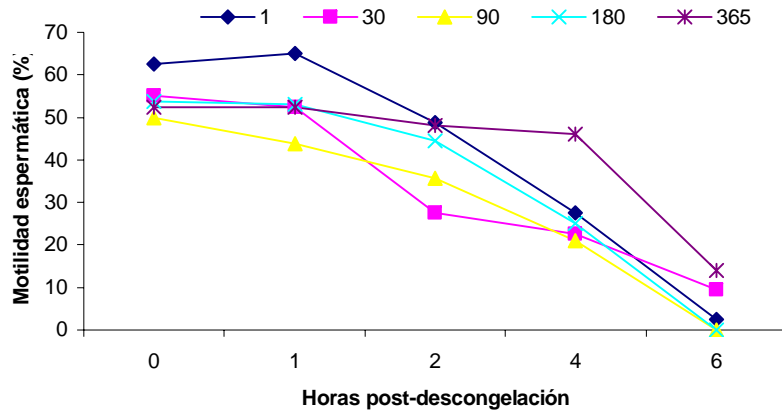


Figura 4.28. Motilidad espermática post-descongelación a lo largo del periodo experimental. Muestras congeladas con glicerol al 6% en ULF.

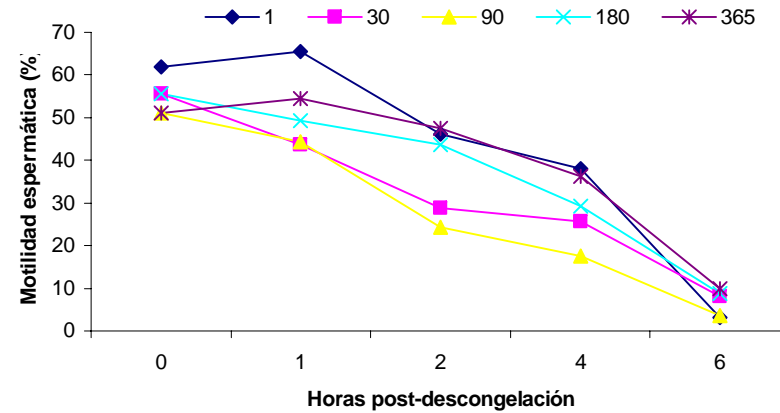


PERRO 8

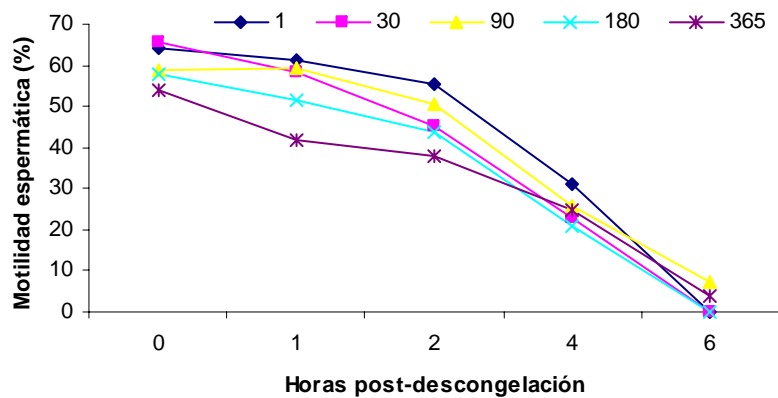
**Figura 4.29.** Motilidad espermática post-descongelación a lo largo del periodo experimental. Muestras congeladas con glicerol al 5% en NL.



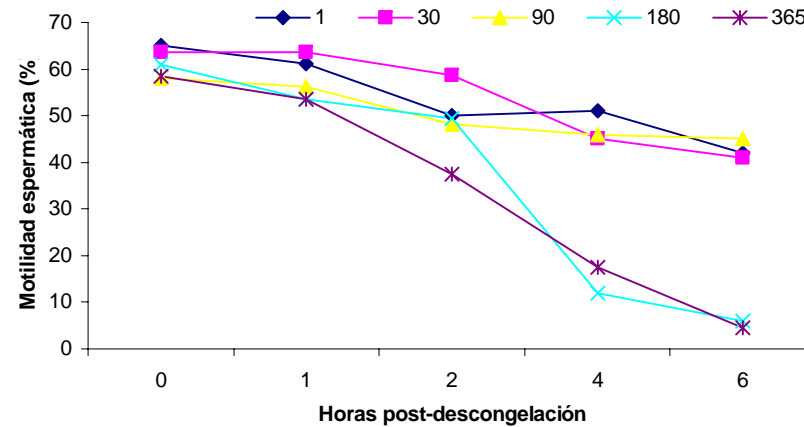
**Figura 4.30.** Motilidad espermática post-descongelación a lo largo del periodo experimental. Muestras congeladas con glicerol al 5% en ULF.



**Figura 4.31.** Motilidad espermática post-descongelación a lo largo del periodo experimental. Muestras congeladas con glicerol al 6% en NL.



**Figura 4.32.** Motilidad espermática post-descongelación a lo largo del periodo experimental. Muestras congeladas con glicerol al 6% en ULF.



#### 4.1.2.4. Vitalidad espermática post-descongelación en los diferentes procedimientos de crioconservación

En las tablas 4.15 a 4.22 se muestran los valores medios de vitalidad espermática, medidos inmediatamente tras la descongelación de la muestra, a lo largo del periodo experimental.

Como regla general, en los días 1, 30 y 90, los valores medios de vitalidad se situaron, en 7 de los 8 ejemplares, siempre por encima del 75-80%, independientemente del método de congelación y de la concentración final de glicerol. En el día 180, se obtuvieron valores de vitalidad que oscilaban entre 70-80%, aunque hubo individuos que mostraron vitalidades medias del 90%. Finalmente, 1 año después de la congelación, existía mayor variación individual en los valores de vitalidad, observándose que si bien había ejemplares que seguían manteniendo valores superiores al 70%, otros oscilaban entre 15-50%; incluso dentro de un mismo perro, los valores variaban en función del método de congelación y de la concentración final de glicerol.

El perro 1 (tabla 4.15) presentó valores de vitalidad muy homogéneos a lo largo de toda la experiencia y para todos los procedimientos valorados. Sólo el día 365 se observó un descenso significativo ( $p < 0.01$ ) en los porcentajes de vitalidad, en todas las muestras testadas. Cuando se compararon los diferentes protocolos entre sí, no se detectaron diferencias significativas.

Tabla 4.15. Porcentaje de vitalidad espermática post-descongelación en el perro 1 a lo largo del periodo experimental (media  $\pm$  SEM)

	Glicerol al 5%		Glicerol al 6%	
	NL	ULF	NL	ULF
Día 1	86.5 <sup>a</sup> $\pm$ 2.3	84.7 <sup>a</sup> $\pm$ 0.7	85.5 <sup>a</sup> $\pm$ 2.1	86.0 <sup>a</sup> $\pm$ 1.4
Día 30	86.5 <sup>a</sup> $\pm$ 1.9	84.5 <sup>a</sup> $\pm$ 2.7	86.0 <sup>a</sup> $\pm$ 1.4	87.0 <sup>a</sup> $\pm$ 2.8
Día 90	91.5 <sup>a</sup> $\pm$ 1.4	83.7 <sup>a</sup> $\pm$ 2.9	90.5 <sup>a</sup> $\pm$ 2.1	89.5 <sup>a</sup> $\pm$ 6.4
Día 180	81.7 <sup>a</sup> $\pm$ 6.0	78.0 <sup>a</sup> $\pm$ 7.4	80.5 <sup>a</sup> $\pm$ 4.9	83.5 <sup>a</sup> $\pm$ 9.2
Día 365	33.7 <sup>b</sup> $\pm$ 5.5	36.7 <sup>b</sup> $\pm$ 8.0	34.7 <sup>b</sup> $\pm$ 7.7	23.0 <sup>b</sup> $\pm$ 1.2

<sup>a,b</sup>: Diferentes letras en una misma columna representan diferencias significativas ( $p < 0.01$ )

En el perro 2 (tabla 4.16), en las muestras con mayor concentración de glicerol, se mostraron valores medios de vitalidad elevados (>75%) prácticamente similares durante los 365 días de duración del estudio. Las pajuelas con un 5% de glicerol de concentración final presentaron valores parecidos durante los primeros 6 meses de conservación, para experimentar un descenso significativo ( $p < 0.01$ ) el día 365, tanto en NL como en el ULF. Al comparar los resultados observados entre los diferentes protocolos evaluados, sólo en las muestras valoradas el día 365, se observaron valores significativamente inferiores ( $p < 0.01$ ) en las dosis crioconservadas con menor concentración de glicerol.

Tabla 4.16. Porcentaje de vitalidad espermática post-descongelación en el perro 2 a lo largo del periodo experimental (media  $\pm$  SEM)

	Glicerol al 5%		Glicerol al 6%	
	NL	ULF	NL	ULF
Día 1	83.0 <sup>a</sup> $\pm$ 0.5	80.0 <sup>a</sup> $\pm$ 1.4	87.0 $\pm$ 7.0	83.3 $\pm$ 2.3
Día 30	77.0 <sup>a</sup> $\pm$ 1.4	79.0 <sup>a</sup> $\pm$ 1.4	86.7 $\pm$ 2.5	85.0 $\pm$ 1.9
Día 90	81.0 <sup>a</sup> $\pm$ 5.7	82.0 <sup>a</sup> $\pm$ 0.0	85.5 $\pm$ 2.1	86.5 $\pm$ 6.4
Día 180	73.5 <sup>a</sup> $\pm$ 6.4	74.5 <sup>a</sup> $\pm$ 4.9	79.3 $\pm$ 4.5	81.6 $\pm$ 4.1
Día 365	37.0 <sup>b,1</sup> $\pm$ 4.2	29.5 <sup>b,1</sup> $\pm$ 0.7	78.5 <sup>2</sup> $\pm$ 3.5	77.8 <sup>2</sup> $\pm$ 4.9

<sup>a,b</sup>: Diferentes letras en una misma columna representan diferencias significativas ( $p < 0.01$ )

<sup>1,2</sup>: Diferentes números en una misma fila representan diferencias significativas ( $p < 0.01$ )

Con respecto al perro 3 (tabla 4.17), pudimos observar que en las muestras que se congelaron utilizando un mayor porcentaje de glicerol, el resultado de vitalidad espermática se mantuvo más o menos constante a lo largo de toda la experiencia y, únicamente, el día 365 se observa un ligero descenso ( $p > 0.1$ ) en los valores obtenidos, independientemente del método de congelación empleado. Asimismo, las pajuelas crioconservadas con menor porcentaje de glicerol mostraron resultados muy parecidos entre 6 y 12 meses tras la congelación, presentando valores similares a los obtenidos en las muestras congeladas con un 6% de glicerol.

Tabla 4.17. Porcentaje de vitalidad espermática post-descongelación en el perro 3 a lo largo del periodo experimental (media  $\pm$  SEM)

	Glicerol al 5%		Glicerol al 6%	
	NL	ULF	NL	ULF
Día 1			87.0 $\pm$ 0.8	87.1 $\pm$ 0.9
Día 30			93.0 $\pm$ 2.1	89.1 $\pm$ 1.4
Día 90			91.0 $\pm$ 1.3	88.2 $\pm$ 1.0
Día 180	87.0 $\pm$ 2.0	84.2 $\pm$ 2.1	88.0 $\pm$ 1.3	89.4 $\pm$ 1.3
Día 365	79.9 $\pm$ 1.3	81.0 $\pm$ 1.7	83.0 $\pm$ 0.7	80.9 $\pm$ 0.6

En el macho 4 (tabla 4.18), si bien las medias de la vitalidad se situaron en valores similares (70-85%) a los de los otros individuos, observamos que el día 365 post-congelación se produjo un descenso generalizado en los valores, siendo esta disminución significativa ( $p < 0.05$ ) en la técnica que utilizaba ULF, con independencia de la concentración de glicerol, si bien fue más evidente ( $p < 0.01$ ) en las dosis seminales con mayor concentración de glicerol.

Tabla 4.18. Porcentaje de vitalidad espermática post-descongelación en el perro 4 a lo largo del periodo experimental (media  $\pm$  SEM)

	Glicerol al 5%		Glicerol al 6%	
	NL	ULF	NL	ULF
Día 1	81.7 $\pm$ 1.5	80.7 <sup>a</sup> $\pm$ 0.8	86.7 <sup>a</sup> $\pm$ 2.5	88.0 <sup>a</sup> $\pm$ 5.5
Día 30	83.6 $\pm$ 3.5	85.0 <sup>a</sup> $\pm$ 5.6	88.0 <sup>a</sup> $\pm$ 2.5	81.7 <sup>a</sup> $\pm$ 1.0
Día 90	78.6 $\pm$ 0.8	85.3 <sup>a</sup> $\pm$ 1.1	84.7 <sup>ab</sup> $\pm$ 6.9	78.0 <sup>a</sup> $\pm$ 7.4
Día 180	76.5 $\pm$ 6.4	75.0 <sup>ab</sup> $\pm$ 8.5	81.3 <sup>ab</sup> $\pm$ 2.9	83.7 <sup>a</sup> $\pm$ 2.1
Día 365	73.0 <sup>1</sup> $\pm$ 5.5	63.0 <sup>b,12</sup> $\pm$ 7.0	74.0 <sup>b,1</sup> $\pm$ 1.4	48.0 <sup>b,2</sup> $\pm$ 11.3

<sup>a,b</sup>: Diferentes letras en una misma columna representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

<sup>1,2</sup>: Diferentes números en una misma fila representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

Con respecto al perro 5 (tabla 4.19), se observó una gran homogeneidad de los valores obtenidos a lo largo de todo el periodo experimental, detectándose resultados prácticamente similares en todos los procedimientos empleados. Sólo se presentaron diferencias significativas, cuando al valorar cada protocolo de congelación por separado, se observó que el día 365 post-congelación, las muestras conservadas con NL y un 6% de glicerol, presentaban un menor porcentaje ( $p < 0.05$ ) de espermatozoides vivos que durante los primeros tres meses de crioconservación.

Tabla 4.19. Porcentaje de vitalidad espermática post-descongelación en el perro 5 a lo largo del periodo experimental (media  $\pm$  SEM)

	Glicerol al 5%		Glicerol al 6%	
	NL	ULF	NL	ULF
Día 1	90.6 $\pm$ 1.0	89.5 $\pm$ 3.5	90.0 <sup>a</sup> $\pm$ 0.0	84.0 $\pm$ 1.4
Día 30	87.5 $\pm$ 0.7	84.5 $\pm$ 4.6	91.0 <sup>a</sup> $\pm$ 2.8	88.5 $\pm$ 0.7
Día 90	85.0 $\pm$ 1.4	85.0 $\pm$ 5.7	90.3 <sup>a</sup> $\pm$ 1.1	89.0 $\pm$ 1.2
Día 180	86.4 $\pm$ 4.2	83.5 $\pm$ 0.7	86.3 <sup>ab</sup> $\pm$ 1.6	84.4 $\pm$ 1.5
Día 365	84.2 $\pm$ 2.8	82.3 $\pm$ 1.4	79.0 <sup>b</sup> $\pm$ 4.2	78.3 $\pm$ 2.2

<sup>a,b</sup>: Diferentes letras en una misma columna representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ )



En el macho 6 (tabla 4.20), cuando se compararon los protocolos por separado, se observaba que cuando se utilizó ULF no hubieron apenas modificaciones en los valores medios de vitalidad espermática durante los primeros 6 meses, pero sí se detectó un descenso significativo ( $p < 0.01$ ) el día 365 post-congelación, con independencia de la concentración final de glicerol; un comportamiento similar se observó en las muestras conservadas en NL, si bien la disminución sólo fue significativa en las muestras con menor concentración de glicerol. Cuando se compararon los diferentes protocolos, sólo se detectaron diferencias significativas el día 365 post-congelación ( $p < 0.05$ ).

Tabla 4.20. Porcentaje de vitalidad espermática post-descongelación en el perro 6 a lo largo del periodo experimental (media  $\pm$  SEM)

	Glicerol al 5%		Glicerol al 6%	
	NL	ULF	NL	ULF
Día 1	88.3 <sup>a</sup> $\pm$ 3.3	90.6 <sup>a</sup> $\pm$ 2.9	85.5 $\pm$ 5.2	86.0 <sup>a</sup> $\pm$ 8.5
Día 30	83.7 <sup>ab</sup> $\pm$ 5.9	89.8 <sup>a</sup> $\pm$ 4.3	82.2 $\pm$ 7.1	84.0 <sup>a</sup> $\pm$ 2.8
Día 90	82.3 <sup>ab</sup> $\pm$ 5.8	85.0 <sup>a</sup> $\pm$ 9.0	87.2 $\pm$ 0.9	88.5 <sup>a</sup> $\pm$ 3.5
Día 180	85.0 <sup>ab</sup> $\pm$ 6.0	86.6 <sup>a</sup> $\pm$ 7.4	85.3 $\pm$ 2.7	82.6 <sup>a</sup> $\pm$ 3.3
Día 365	72.3 <sup>b,1</sup> $\pm$ 2.6	59.0 <sup>b,2</sup> $\pm$ 2.5	79.8 <sup>1</sup> $\pm$ 5.4	49.0 <sup>b,2</sup> $\pm$ 8.5

<sup>a,b</sup>: Diferentes letras en una misma columna representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

<sup>1,2</sup>: Diferentes números en una misma fila representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

Con respecto al perro 7 (tabla 4.21), el principal hallazgo detectado fue que tras un año de conservación y, con independencia del porcentaje de glicerol final presente, los valores descendían significativamente en ambos procedimientos, si bien era más evidente en las muestras congeladas en ULF ( $p < 0.01$ ) que en las conservadas en NL ( $p < 0.05$ ). Cuando se compararon los protocolos entre sí, se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) sólo el día 365 post-congelación.

Tabla 4.21. Porcentaje de vitalidad espermática post-descongelación en el perro 7 a lo largo del periodo experimental (media  $\pm$  SEM)

	Glicerol al 5%		Glicerol al 6%	
	NL	ULF	NL	ULF
Día 1	86.3 <sup>a</sup> $\pm$ 5.9	85.7 <sup>a</sup> $\pm$ 5.2	88.0 <sup>ab</sup> $\pm$ 1.4	92.5 <sup>a</sup> $\pm$ 3.5
Día 30	83.0 <sup>a</sup> $\pm$ 1.4	82.8 <sup>a</sup> $\pm$ 2.1	90.5 <sup>a</sup> $\pm$ 3.5	85.5 <sup>a</sup> $\pm$ 2.1
Día 90	88.9 <sup>a</sup> $\pm$ 3.2	86.3 <sup>a</sup> $\pm$ 4.7	84.0 <sup>ab</sup> $\pm$ 3.5	80.8 <sup>ab</sup> $\pm$ 7.1
Día 180	77.7 <sup>ab</sup> $\pm$ 2.5	77.6 <sup>a</sup> $\pm$ 1.9	86.5 <sup>ab</sup> $\pm$ 4.9	86.0 <sup>a</sup> $\pm$ 3.4
Día 365	65.7 <sup>b,1</sup> $\pm$ 5.3	48.0 <sup>b,2</sup> $\pm$ 3.8	77.5 <sup>b,1</sup> $\pm$ 2.1	64.5 <sup>b,1</sup> $\pm$ 5.0

<sup>a,b</sup>: Diferentes letras en una misma columna representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

<sup>1,2</sup>: Diferentes números en una misma fila representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

Finalmente, el perro 8 (tabla 4.22) mostró valores medios de vitalidad superiores al 80% en la casi totalidad de los días valorados, con independencia de la concentración de glicerol o del protocolo de congelación. Sólo se detectaron valores más bajos tras 1 año de conservación, siendo significativo ( $p < 0.05$ ) en las muestras crioconservadas con ULF (6% glicerol).

Tabla 4.22. Porcentaje de vitalidad espermática post-descongelación en el perro 8 a lo largo del periodo experimental (media  $\pm$  SEM)

	Glicerol al 5%		Glicerol al 6%	
	NL	ULF	NL	ULF
Día 1	89.0 $\pm$ 2.8	89.7 $\pm$ 1.4	88.9 $\pm$ 5.1	91.1 <sup>a</sup> $\pm$ 2.0
Día 30	91.0 $\pm$ 4.8	90.3 $\pm$ 2.8	90.0 $\pm$ 2.8	87.2 <sup>ab</sup> $\pm$ 1.4
Día 90	82.5 $\pm$ 3.5	81.4 $\pm$ 7.7	90.3 $\pm$ 1.5	88.2 <sup>a</sup> $\pm$ 1.2
Día 180	81.6 $\pm$ 4.8	81.7 $\pm$ 2.2	83.4 $\pm$ 6.4	83.0 <sup>ab</sup> $\pm$ 4.9
Día 365	80.7 $\pm$ 5.5	80.0 $\pm$ 7.0	81.7 $\pm$ 3.2	77.5 <sup>b</sup> $\pm$ 1.8

<sup>a,b</sup>: Diferentes letras en una misma columna representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

Si se valoran los resultados de vitalidad espermática entre los diferentes donantes, los perros se pueden agrupar en dos grupos con un comportamiento muy parecido. Los perros 3, 5 y 8 presentaron valores medios de vitalidad muy homogéneos a lo largo de todo el periodo experimental, independientemente de la técnica de congelación y de la composición del diluyente empleado. No obstante, los valores más elevados se presentaron los días 1, 30 y 90 post-congelación, para sufrir un ligero descenso (no significativo en la mayoría de las muestras valoradas) los días 180 y 365.

Por otro lado, los perros 1, 2, 4, 6 y 7 mostraron un descenso significativo el día 365, observándose una enorme variabilidad individual: el perro 1 mostraba este descenso en todas las muestras valoradas independientemente del método de congelación empleado y de la concentración final de glicerol. El perro 2 presentaba este descenso solamente en las muestras que se congelaron con un 5% de glicerol. Finalmente, los perros 4, 6 y 7 presentaron los valores de vitalidad más bajos en las muestras que se congelaron en ultracongeladores de  $-152\text{ }^{\circ}\text{C}$  independientemente de la concentración final de glicerol en el diluyente.

Las tablas 4.23 y 4.24 expresan las correlaciones de motilidad espermática de cada ejemplar en función del método de congelación y la concentración final de glicerol, así como las correlaciones entre motilidad y vitalidad espermática en cada uno de los 8 machos utilizados en esta experiencia.

Tabla 4.23. Correlaciones de motilidad espermática en cada macho, en función del protocolo de congelación empleado (NL, ULF) y la concentración final de glicerol (5%, 6%)

Macho 1	NL 6%	ULF 5%	Macho 2	NL 6%	ULF 5%
NL 5%	0.75	0.77	NL 5%	0.71	0.69
ULF 6%	0.69	0.70	ULF 5%	0.78	0.76
Macho 3	NL 6%	ULF 5%	Macho 4	NL 6%	ULF 5%
NL 5%	0.82	0.78	NL 5%	0.51	0.49
ULF 6%	0.77	0.72	ULF 6%	0.60	0.70
Macho 5	NL 6%	ULF 5%	Macho 6	NL 6%	ULF 5%
NL 5%	0.65	0.72	NL 5%	0.44	0.62
ULF 6%	0.71	0.66	ULF 6%	0.43	0.73
Macho 7	NL 6%	ULF 5%	Macho 8	NL 6%	ULF 5%
NL 5%	0.55	0.58	NL 5%	0.73	0.61
ULF 6%	0.64	0.60	ULF 6%	0.71	0.69

Tabla 4.24. Correlaciones entre motilidad y vitalidad espermática en cada macho, en función del protocolo de congelación empleado (NL, ULF) y la concentración final de glicerol (5%, 6%)

	NL 5%	NL 6%	ULF 5%	ULF 6%		NL 5%	NL 6%	ULF 5%	ULF 6%
Macho 1	0.85	0.87	0.78	0.89	Macho 2	0.68	0.67	0.59	0.64
Macho 3	0.9	0.91	0.74	0.82	Macho 4	0.47	0.75	0.59	0.89
Macho 5	0.70	0.82	0.68	0.62	Macho 6	0.70	0.66	0.67	0.88
Macho 7	0.75	0.77	0.68	0.80	Macho 8	0.82	0.86	0.79	0.77

#### 4.1.2.5. Porcentaje de acrosomías post-descongelación en los distintos protocolos de criopreservación

En las tablas 4.25 a 4.32 se muestran los valores medios de acrosomías observados en cada ejemplar durante todo el periodo experimental. Los valores observados presentaron un rango medio entre  $3.5 \pm 0.7$  y  $16.7 \pm 3.2\%$  (rango individual: 2-21%). Sin embargo, los días 1 y 30 post-congelación, los valores medios se situaron entre 3.0-8.0%, independientemente del método de congelación empleado y del porcentaje final de glicerol, observándose valores ligeramente superiores a partir del día 90, presentándose los resultados más altos el día 365.

En general, los perros que mostraron los niveles más altos de acrosomías lo hicieron en las muestras que utilizaron un 6% de concentración final de glicerol, con independencia del método de congelación empleado. No obstante, se observaba una notable dispersión en los resultados, con valores superiores al 15%, tanto en las muestras crioconservadas con NL, como aquellas congeladas en ULF.

El macho 1 (tabla 4.25) mostró unos valores medios inferiores al 9% durante los primeros 6 meses del estudio, sin diferencias manifiestas entre protocolos de congelación. No obstante, al año de su congelación, las dosis evaluadas presentaban valores superiores al 12% ( $p < 0.05$ ), independientemente del método de congelación y del porcentaje de glicerol empleado.

En el perro 2 (tabla 4.26), cuando se valoró cada protocolo por separado, aunque se observaron diferencias en los primeros 30 días de crioconservación, no llegaron a ser significativas. A partir del tercer mes, se observa un aumento generalizado en el porcentaje de acrosomías, si bien es más evidente en las muestras con mayor concentración de glicerol ( $p < 0.05$ ). Al comparar los protocolos entre sí, sólo el día 90 post-congelación se detectan diferencias ( $p < 0.05$ ), siendo superior el porcentaje de acrosomías en las muestras con mayor concentración de glicerol.

El macho 3 (tabla 4.27) presentó una gran uniformidad en el porcentaje de acrosomías, mostrando como valor medio máximo un 8%. En las muestras con un 5% de glicerol, los valores fueron prácticamente similares, en los periodos evaluados y en ambas técnicas de congelación. Un resultado muy parecido se encontró en aquellas pajuelas con mayor concentración de glicerol, con unos valores medios que oscilaron entre 5.0 y 7.7%.

Tabla 4.25. Porcentaje de acrosomías post-descongelación en el perro 1 a lo largo del periodo experimental (media  $\pm$  SEM)

	Glicerol al 5%		Glicerol al 6%	
	NL	ULF	NL	ULF
Día 1	7.0 <sup>a</sup> $\pm$ 0.9	6.5 <sup>a</sup> $\pm$ 1.1	5.9 <sup>a</sup> $\pm$ 1.4	5.4 <sup>ab</sup> $\pm$ 2.1
Día 30	5.7 <sup>a</sup> $\pm$ 1.1	5.9 <sup>a</sup> $\pm$ 0.5	7.2 <sup>ab</sup> $\pm$ 2.8	5.9 <sup>a</sup> $\pm$ 0.9
Día 90	7.2 <sup>a</sup> $\pm$ 1.0	8.3 <sup>ab</sup> $\pm$ 1.5	7.2 <sup>ab</sup> $\pm$ 1.4	6.5 <sup>ab</sup> $\pm$ 2.1
Día 180	7.3 <sup>a</sup> $\pm$ 0.8	7.3 <sup>a</sup> $\pm$ 1.1	7.4 <sup>ab</sup> $\pm$ 1.4	7.0 <sup>ab</sup> $\pm$ 1.4
Día 365	16.7 <sup>b</sup> $\pm$ 3.2	15.7 <sup>b</sup> $\pm$ 2.0	12.3 <sup>b</sup> $\pm$ 2.3	12.3 <sup>b</sup> $\pm$ 3.6

<sup>a,b</sup>: Diferentes letras en una misma columna representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

Tabla 4.26. Porcentaje de acrosomías post-descongelación en el perro 2 a lo largo del periodo experimental (media  $\pm$  SEM)

	Glicerol al 5%		Glicerol al 6%	
	NL	ULF	NL	ULF
Día 1	3.5 <sup>a</sup> $\pm$ 0.7	4.0 <sup>a</sup> $\pm$ 1.4	5.0 <sup>a</sup> $\pm$ 1.1	4.3 <sup>a</sup> $\pm$ 1.2
Día 30	6.9 <sup>ab</sup> $\pm$ 1.2	7.0 <sup>ab</sup> $\pm$ 1.4	7.5 <sup>a</sup> $\pm$ 1.0	5.9 <sup>a</sup> $\pm$ 0.7
Día 90	7.5 <sup>ab,1</sup> $\pm$ 0.7	5.8 <sup>ab,1</sup> $\pm$ 0.7	12.5 <sup>b,2</sup> $\pm$ 0.7	12.5 <sup>b,12</sup> $\pm$ 3.5
Día 180	10.0 <sup>b</sup> $\pm$ 1.0	14.5 <sup>b</sup> $\pm$ 0.7	14.3 <sup>b</sup> $\pm$ 2.3	12.0 <sup>b</sup> $\pm$ 1.4
Día 365	8.8 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.7	8.5 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.7	12.8 <sup>b</sup> $\pm$ 3.0	13.0 <sup>b</sup> $\pm$ 2.8

<sup>a,b</sup>: Diferentes letras en una misma columna representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

<sup>1,2</sup>: Diferentes números en una misma fila representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

Tabla 4.27. Porcentaje de acrosomías post-descongelación en el perro 3 a lo largo del periodo experimental (media  $\pm$  SEM)

	Glicerol al 5%		Glicerol al 6%	
	NL	ULF	NL	ULF
Día 1			5.2 $\pm$ 0.3	6.2 $\pm$ 0.6
Día 30			5.8 $\pm$ 0.4	5.0 $\pm$ 1.8
Día 90			7.0 $\pm$ 1.0	5.2 $\pm$ 1.4
Día 180	8.0 $\pm$ 0.7	6.9 $\pm$ 1.2	6.1 $\pm$ 1.9	6.0 $\pm$ 1.1
Día 365	7.5 $\pm$ 1.0	6.7 $\pm$ 0.6	6.8 $\pm$ 0.9	7.7 $\pm$ 0.9

Tabla 4.28. Porcentaje de acrosomías post-descongelación en el perro 4 a lo largo del periodo experimental (media  $\pm$  SEM)

	Glicerol al 5%		Glicerol al 6%	
	NL	ULF	NL	ULF
Día 1	6.0 $\pm$ 2.1	6.0 $\pm$ 1.9	4.3 <sup>a</sup> $\pm$ 0.4	4.7 <sup>a</sup> $\pm$ 0.8
Día 30	8.0 $\pm$ 2.1	7.3 $\pm$ 2.2	7.1 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.4	6.7 <sup>ab</sup> $\pm$ 1.4
Día 90	8.3 $\pm$ 1.1	8.3 $\pm$ 0.4	12.8 <sup>b</sup> $\pm$ 1.9	13.7 <sup>b</sup> $\pm$ 2.2
Día 180	8.3 $\pm$ 1.8	9.2 $\pm$ 2.9	9.0 <sup>ab</sup> $\pm$ 1.8	9.7 <sup>ab</sup> $\pm$ 1.5
Día 365	8.6 $\pm$ 1.1	9.3 $\pm$ 1.6	11.5 <sup>b</sup> $\pm$ 1.7	11.8 <sup>b</sup> $\pm$ 1.4

<sup>a,b</sup>: Diferentes letras en una misma columna representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

Con respecto al macho 4 (tabla 4.28), no se observaron diferencias significativas a lo largo del tiempo en aquellas muestras congeladas con un 5% de glicerol, con independencia del método de congelación empleado. Sin embargo, las muestras con mayor concentración de glicerol presentaron una evolución diferente, con valores relativamente bajos durante los primeros 30 días de conservación, pero, a partir de ese momento, experimentaron un incremento en el porcentaje de acrosomías observadas, sobre todo en las valoraciones realizadas los días 90 y 365 del estudio ( $p < 0.05$ ).

El perro 5 (tabla 4.29) fue uno de los ejemplares que presentaba valores más homogéneos en el porcentaje de acrosomías, sin detectarse diferencias significativas ( $p > 0.1$ ) en las muestras valoradas dentro de cada protocolo de congelación. Del mismo modo, cuando se compararon los diferentes procedimientos entre sí, no se observaron diferencias ni entre técnicas de crioconservación ni en función de la concentración final de glicerol en el diluyente.

En el macho 6 (tabla 4.30), al valorar cada protocolo a lo largo del tiempo, se observa que los valores de espermatozoides con acrosomas anormales se incrementaban lenta pero, progresivamente, conforme aumentaba el tiempo de criopreservación de las dosis seminales, mostrando los valores más elevados entre los 6 y 12 meses de conservación ( $p < 0.05$ ); sólo en las muestras conservadas en NL con un 6% de glicerol, estas variaciones no llegan a ser significativas. No se detectaron diferencias al comparar los diferentes protocolos entre sí.

El perro 7 (tabla 4.31) mostraba niveles relativamente homogéneos de acrosomías a lo largo del periodo experimental, en las muestras congeladas mediante ULF, con independencia de la concentración final de glicerol. No obstante, en las muestras crioconservadas en NL, se determinó un ligero incremento en el porcentaje de acrosomías, fundamentalmente en las muestras con mayor concentración de glicerol, donde las diferencias llegaron a ser significativas (día 1 *vs* día 90,  $p < 0.05$ ).

Finalmente en el macho 8 (tabla 4.32), aunque se detectó que en las muestras con menor concentración de glicerol existía un mayor porcentaje de espermatozoides con acrosoma anormal, la diferencia no llegó a ser nunca significativa. Asimismo, dentro de cada protocolo, los valores fueron bastante uniformes durante todo el periodo experimental.

Tabla 4.29. Porcentaje de acrosomías post-descongelación en el perro 5 a lo largo del periodo experimental (media  $\pm$  SEM)

	Glicerol al 5%		Glicerol al 6%	
	NL	ULF	NL	ULF
Día 1	5.8 $\pm$ 1.4	5.5 $\pm$ 0.7	5.9 $\pm$ 0.0	5.1 $\pm$ 1.4
Día 30	7.1 $\pm$ 1.4	6.5 $\pm$ 0.7	6.1 $\pm$ 3.5	5.8 $\pm$ 2.8
Día 90	6.8 $\pm$ 1.4	7.0 $\pm$ 2.1	6.9 $\pm$ 0.7	6.3 $\pm$ 0.4
Día 180	7.2 $\pm$ 0.7	6.7 $\pm$ 0.4	7.0 $\pm$ 1.1	7.3 $\pm$ 0.4
Día 365	6.5 $\pm$ 2.8	6.8 $\pm$ 2.8	6.3 $\pm$ 0.4	6.7 $\pm$ 1.5

Tabla 4.30. Porcentaje de acrosomías post-descongelación en el perro 6 a lo largo del periodo experimental (media  $\pm$  SEM)

	Glicerol al 5%		Glicerol al 6%	
	NL	ULF	NL	ULF
Día 1	4.3 <sup>a</sup> $\pm$ 0.5	4.0 <sup>a</sup> $\pm$ 1.6	5.5 $\pm$ 0.7	4.5 <sup>a</sup> $\pm$ 0.7
Día 30	5.4 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.8	4.0 <sup>a</sup> $\pm$ 1.2	6.2 $\pm$ 2.8	5.0 <sup>a</sup> $\pm$ 0.2
Día 90	6.2 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.7	4.7 <sup>a</sup> $\pm$ 0.4	4.9 $\pm$ 0.9	5.4 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.9
Día 180	7.2 <sup>ab</sup> $\pm$ 1.5	10.5 <sup>b</sup> $\pm$ 1.0	7.0 $\pm$ 1.0	7.2 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.7
Día 365	9.3 <sup>b</sup> $\pm$ 0.8	11.9 <sup>b</sup> $\pm$ 0.7	7.2 $\pm$ 0.7	11.7 <sup>b</sup> $\pm$ 1.6

<sup>a,b</sup>: Diferentes letras en una misma columna representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

Tabla 4.31. Porcentaje de acrosomías post-descongelación en el perro 7 a lo largo del periodo experimental (media  $\pm$  SEM)

	Glicerol al 5%		Glicerol al 6%	
	NL	ULF	NL	ULF
Día 1	6.0 $\pm$ 0.7	5.3 $\pm$ 0.8	4.9 <sup>a</sup> $\pm$ 0.7	5.9 $\pm$ 0.7
Día 30	5.9 $\pm$ 1.8	5.8 $\pm$ 1.2	7.0 <sup>ab</sup> $\pm$ 1.4	6.5 $\pm$ 1.4
Día 90	6.7 $\pm$ 0.9	6.8 $\pm$ 0.7	11.5 <sup>b</sup> $\pm$ 1.3	9.6 $\pm$ 1.4
Día 180	10.2 $\pm$ 1.7	8.9 $\pm$ 1.6	7.8 <sup>ab</sup> $\pm$ 1.2	8.5 $\pm$ 0.7
Día 365	7.9 $\pm$ 0.7	7.7 $\pm$ 1.6	7.0 <sup>ab</sup> $\pm$ 1.7	9.0 $\pm$ 3.2

<sup>a,b</sup>: Diferentes letras en una misma columna representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

Tabla 4.32. Porcentaje de acrosomías post-descongelación en el perro 8 a lo largo del periodo experimental (media  $\pm$  SEM)

	Glicerol al 5%		Glicerol al 6%	
	NL	ULF	NL	ULF
Día 1	5.5 $\pm$ 2.1	6.1 $\pm$ 0.2	4.6 $\pm$ 1.5	6.1 $\pm$ 1.2
Día 30	7.0 $\pm$ 1.4	6.5 $\pm$ 0.7	4.3 $\pm$ 1.1	6.3 $\pm$ 0.4
Día 90	9.1 $\pm$ 3.0	9.0 $\pm$ 2.9	6.4 $\pm$ 0.4	7.2 $\pm$ 0.8
Día 180	9.1 $\pm$ 1.6	7.9 $\pm$ 1.1	6.0 $\pm$ 0.8	6.7 $\pm$ 0.8
Día 365	8.3 $\pm$ 0.8	8.6 $\pm$ 2.2	5.7 $\pm$ 1.6	6.3 $\pm$ 0.8

Desde el punto de vista individual, se observó que de los 8 perros utilizados en el estudio, 3 de ellos mantuvieron siempre valores medios de acrosomías inferiores al 10 % (perros 3, 5 y 8). Los perros 2 y 4 mostraron un porcentaje de acrosomías superior al 10% en las muestras congeladas con un 6% de glicerol (días 90 y 365), con independencia de la técnica de congelación empleada, mientras que el perro 7 presentaba valores medios superiores al 10% en muestras congeladas en nitrógeno líquido (días 90 y 180), independientemente de la concentración final de glicerol.

Finalmente, el perro 1 presentaba valores superiores al 10% el día 365 con independencia del método de congelación y del porcentaje de glicerol empleado, mientras que el macho 6 mostraba valores medios de acrosomías superiores al 10% únicamente en las muestras congeladas con ultracongeladores de -152 °C.



#### 4.1.2.6. Porcentaje de morfoanomalías post-descongelación en los diferentes protocolos de crioconservación

En las tablas 4.33 a 4.40 se muestran los valores de morfoanomalías obtenidos a lo largo de todo el periodo experimental para cada ejemplar, en cada una de las técnicas estudiadas y en función del porcentaje de glicerol presente en el diluyente empleado.

En general, el porcentaje medio de morfoanomalías osciló entre  $4.0 \pm 0.9$  y  $22.7 \pm 2.2\%$  (rango individual: 1-33%), si bien los valores más frecuentemente observados se situaron por encima del 10%, independientemente del ejemplar, del día de valoración, de la técnica y del porcentaje de glicerol.

El perro 1 (tabla 4.33) mostraba un porcentaje ligeramente mayor de morfoanomalías en las muestras que se congelaron con un menor porcentaje de glicerol (día 365,  $p < 0.05$ ), si bien valores elevados también se detectaron en aquellas muestras con un 6% de glicerol, independientemente de la técnica de congelación empleada. Al analizar cada protocolo por separado, se observó que en la mayoría de los procedimientos existían diferencias en los porcentajes medios de morfoanomalías, si bien sólo en las muestras congeladas con NL tenía significación estadística.

Tabla 4.33. Porcentaje de morfoanomalías post-descongelación en el perro 1 a lo largo del periodo experimental (media  $\pm$  SEM)

	Glicerol al 5%		Glicerol al 6%	
	NL	ULF	NL	ULF
Día 1	13.0 <sup>ab</sup> $\pm$ 5.5	11.5 $\pm$ 2.1	6.8 <sup>a</sup> $\pm$ 1.0	7.5 $\pm$ 2.1
Día 30	7.5 <sup>a</sup> $\pm$ 2.4	9.2 $\pm$ 3.1	13.5 <sup>b</sup> $\pm$ 1.5	9.5 $\pm$ 0.7
Día 90	10.7 <sup>a</sup> $\pm$ 1.5	9.3 $\pm$ 2.9	8.0 <sup>ab</sup> $\pm$ 2.8	8.0 $\pm$ 2.8
Día 180	12.0 <sup>a</sup> $\pm$ 2.4	11.7 $\pm$ 5.4	11.0 <sup>ab</sup> $\pm$ 0.3	12.2 $\pm$ 3.5
Día 365	22.7 <sup>b,1</sup> $\pm$ 2.2	16.3 <sup>12</sup> $\pm$ 2.8	9.7 <sup>ab, 2</sup> $\pm$ 2.2	8.7 <sup>2</sup> $\pm$ 3.7

<sup>a,b</sup>: Diferentes letras en una misma columna representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

<sup>1,2</sup>: Diferentes números en una misma fila representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

En el caso del perro 2 (tabla 4.34), los valores de morfoanomalías fueron bastante heterogéneos entre tratamientos y diluyentes; sin embargo, se observa que los valores más elevados se contabilizaron entre los 6 y 12 meses de crioconservación. Durante los primeros 90 días, aunque los valores medios fueron diferentes entre los distintos protocolos no se observaron diferencias significativas. No obstante, al año de la congelación, se observó que existía mayor porcentaje de morfoanomalías en aquellas muestras cuyo diluyente poseía mayor concentración de glicerol ( $p < 0.05$ ).

Tabla 4.34. Porcentaje de morfoanomalías post-descongelación en el perro 2 a lo largo del periodo experimental (media  $\pm$  SEM)

	Glicerol al 5%		Glicerol al 6%	
	NL	ULF	NL	ULF
Día 1	10.0 $\pm$ 1.4	8.5 <sup>ab</sup> $\pm$ 3.5	8.5 <sup>a</sup> $\pm$ 2.2	9.6 <sup>a</sup> $\pm$ 2.5
Día 30	7.0 $\pm$ 4.2	5.9 <sup>a</sup> $\pm$ 0.7	9.7 <sup>a</sup> $\pm$ 4.0	9.7 <sup>a</sup> $\pm$ 2.7
Día 90	12.5 $\pm$ 2.1	7.8 <sup>ab</sup> $\pm$ 1.4	8.5 <sup>a</sup> $\pm$ 2.7	12.5 <sup>ab</sup> $\pm$ 3.1
Día 180	15.5 $\pm$ 3.5	15.5 <sup>b</sup> $\pm$ 2.1	15.1 <sup>ab</sup> $\pm$ 4.9	14.3 <sup>ab</sup> $\pm$ 3.5
Día 365	13.0 <sup>1</sup> $\pm$ 0.8	12.7 <sup>ab,1</sup> $\pm$ 2.0	21.5 <sup>b,2</sup> $\pm$ 1.8	22.2 <sup>b,2</sup> $\pm$ 2.1

<sup>a,b</sup>: Diferentes letras en una misma columna representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

<sup>1,2</sup>: Diferentes números en una misma fila representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

En referencia al perro 3 (tabla 4.35) presentaba, en general, porcentajes de morfoanomalías inferiores al 12% en casi todos los procedimientos valorados, independientemente del protocolo de congelación y tipo de diluyente. En las muestras con menor concentración de glicerol, los valores no fueron diferentes ni dentro de cada protocolo, ni al compararlos entre sí; en las muestras con mayor concentración de glicerol y conservadas en ultracongelador, el aspecto más destacado fue que las muestras valoradas el día 90 post-congelación, presentaron un menor porcentaje de morfoanomalías ( $p < 0.05$ ) que tras 1 año de congelación.

Tabla 4.35. Porcentaje de morfoanomalías post-descongelación en el perro 3 a lo largo del periodo experimental (media  $\pm$  SEM)

	Glicerol al 5%		Glicerol al 6%	
	NL	ULF	NL	ULF
Día 1			9.1 $\pm$ 1.1	6.0 <sup>a</sup> $\pm$ 1.5
Día 30			7.8 $\pm$ 0.6	7.9 <sup>a</sup> $\pm$ 0.8
Día 90			7.6 $\pm$ 0.5	4.8 <sup>a</sup> $\pm$ 0.9
Día 180	9.1 $\pm$ 0.8	10.3 $\pm$ 0.5	12.0 $\pm$ 0.8	7.4 <sup>a</sup> $\pm$ 0.4
Día 365	8.8 $\pm$ 0.5	9.4 $\pm$ 1.0	12.0 $\pm$ 0.5	12.6 <sup>b</sup> $\pm$ 1.0

<sup>a,b</sup>: Diferentes letras en una misma columna representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

El macho 4 (tabla 4.36) mostró, en la mayoría de los periodos testados, un número ligeramente superior de morfoanomalías en aquellas muestras que se congelaron utilizando NL frente a la técnica con ULF; no obstante, estas variaciones no fueron significativamente diferentes. Asimismo, el valor medio más elevado de morfoanomalías se detectó en las pajuelas conservadas mediante ULF (5% glicerol) y, fue en este método donde se determinaron diferencias apreciables ( $p < 0.05$ ; días 1 y 30 vs día 365)

Tabla 4.36. Porcentaje de morfoanomalías post-descongelación en el perro 4 a lo largo del periodo experimental (media  $\pm$  SEM)

	Glicerol al 5%		Glicerol al 6%	
	NL	ULF	NL	ULF
Día 1	11.8 $\pm$ 3.7	9.7 <sup>a</sup> $\pm$ 1.1	10.3 $\pm$ 0.8	9.0 $\pm$ 0.7
Día 30	13.0 $\pm$ 2.1	8.0 <sup>a</sup> $\pm$ 2.0	11.0 $\pm$ 2.1	10.6 $\pm$ 1.1
Día 90	11.7 $\pm$ 2.5	11.8 <sup>ab</sup> $\pm$ 2.1	11.7 $\pm$ 2.9	8.7 $\pm$ 1.1
Día 180	16.6 $\pm$ 1.6	17.7 <sup>ab</sup> $\pm$ 2.5	15.0 $\pm$ 3.9	12.0 $\pm$ 3.7
Día 365	19.0 $\pm$ 6.5	22.3 <sup>b</sup> $\pm$ 3.1	16.5 $\pm$ 4.9	12.0 $\pm$ 2.8

<sup>a,b</sup>: Diferentes letras en una misma columna representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

En el caso del perro 5 (tabla 4.37), se mostraron los valores más elevados el día 365, con independencia de la metodología y del diluyente empleado, si bien los valores de morfoanomalías siempre fueron inferiores al 15%. Además, se observó un comportamiento no uniforme entre los diferentes protocolos puesto que, en algunos días, se observaban porcentajes superiores de morfoanomalías en aquellas muestras que se congelaron en ULF frente a las conservadas en NL, mientras que en otros periodos ocurría exactamente lo contrario. En cualquier caso, las diferencias observadas nunca fueron estadísticamente significativas.

Tabla 4.37. Porcentaje de morfoanomalías post-descongelación en el perro 5 a lo largo del periodo experimental (media  $\pm$  SEM)

	Glicerol al 5%		Glicerol al 6%	
	NL	ULF	NL	ULF
Día 1	9.0 $\pm$ 2.8	6.0 $\pm$ 2.8	7.5 $\pm$ 0.7	8.50 $\pm$ 0.7
Día 30	6.8 $\pm$ 2.1	12.4 $\pm$ 4.2	7.0 $\pm$ 2.8	11.5 $\pm$ 0.7
Día 90	5.9 $\pm$ 0.7	9.2 $\pm$ 1.4	7.3 $\pm$ 2.9	7.7 $\pm$ 2.2
Día 180	8.2 $\pm$ 1.4	10.0 $\pm$ 2.8	12.6 $\pm$ 1.8	11.2 $\pm$ 1.1
Día 365	12.5 $\pm$ 4.9	11.1 $\pm$ 5.7	12.7 $\pm$ 3.2	14.0 $\pm$ 3.5

El macho 6 (tabla 4.38) mostró unos porcentajes de morfoanomalías prácticamente uniformes a lo largo de todo el periodo experimental, sin existir diferencias apreciables dentro de cada protocolo de congelación. Cuando se compararon los diferentes procedimientos entre sí, aunque en algunos días puntuales (día 30) se detectaron valores más bajos en un método en comparación con otro, estas variaciones nunca llegaron a tener significación estadística.

Tabla 4.38. Porcentaje de morfoanomalías post-descongelación en el perro 6 a lo largo del periodo experimental (media  $\pm$  SEM)

	Glicerol al 5%		Glicerol al 6%	
	NL	ULF	NL	ULF
Día 1	11.6 $\pm$ 5.8	12.7 $\pm$ 3.6	11.5 $\pm$ 4.2	11.5 $\pm$ 2.1
Día 30	8.0 $\pm$ 1.1	9.0 $\pm$ 2.1	13.2 $\pm$ 1.4	12.0 $\pm$ 2.8
Día 90	10.4 $\pm$ 3.9	9.6 $\pm$ 0.8	12.0 $\pm$ 2.8	11.5 $\pm$ 2.1
Día 180	12.3 $\pm$ 5.9	11.5 $\pm$ 8.2	14.3 $\pm$ 2.5	11.7 $\pm$ 3.2
Día 365	13.1 $\pm$ 2.2	16.3 $\pm$ 4.1	13.4 $\pm$ 0.4	12.0 $\pm$ 7.4

El perro 7 (tabla 4.39) presentó unos porcentajes bastante homogéneos en la distribución de morfoanomalías, con valores medios entre un 7.7 y un 14.5%. Dentro de cada protocolo, no se observaron diferencias en los 365 días de crioconservación, mientras que al comparar los diferentes procedimientos entre sí, se observaba que aunque la mayor parte de las muestras que se congelaron utilizando un 6% de glicerol presentaban un porcentaje de morfoanomalías ligeramente superior, estas diferencias nunca llegaron a ser significativamente diferentes.

Tabla 4.39. Porcentaje de morfoanomalías post-descongelación en el perro 7 a lo largo del periodo experimental (media  $\pm$  SEM)

	Glicerol al 5%		Glicerol al 6%	
	NL	ULF	NL	ULF
Día 1	11.2 $\pm$ 6.0	10.0 $\pm$ 1.4	11.4 $\pm$ 0.4	10.6 $\pm$ 1.0
Día 30	9.3 $\pm$ 2.3	7.7 $\pm$ 1.8	12.2 $\pm$ 2.8	14.5 $\pm$ 4.8
Día 90	9.8 $\pm$ 3.6	11.0 $\pm$ 1.2	11.6 $\pm$ 0.7	11.3 $\pm$ 4.2
Día 180	12.0 $\pm$ 3.5	12.5 $\pm$ 1.2	10.5 $\pm$ 0.7	13.5 $\pm$ 0.7
Día 365	10.2 $\pm$ 4.9	9.7 $\pm$ 4.5	10.5 $\pm$ 2.1	13.4 $\pm$ 2.8

En el caso del perro 8 (tabla 4.40), se observaba que los porcentajes de morfoanomalías superiores al 10% se presentaban en todos los procedimientos valorados; no obstante, en el caso de las pajuelas crioconservadas con un 5% de glicerol, se presentaron un número mayor de muestras con porcentajes elevados de morfoanomalías. Asimismo, dentro de cada protocolo de congelación se observaba que los mayores porcentajes de morfoanomalías se detectaron en las muestras conservadas durante 6-12 meses.

Tabla 4.40. Porcentaje de morfoanomalías post-descongelación en el perro 8 a lo largo del periodo experimental (media  $\pm$  SEM)

	Glicerol al 5%		Glicerol al 6%	
	NL	ULF	NL	ULF
Día 1	12.5 <sup>ab, 1</sup> $\pm$ 2.4	12.8 <sup>1</sup> $\pm$ 0.8	6.3 <sup>a,2</sup> $\pm$ 1.1	10.3 <sup>12</sup> $\pm$ 4.1
Día 30	11.0 <sup>ab,12</sup> $\pm$ 1.4	11.8 <sup>12</sup> $\pm$ 2.3	6.0 <sup>a,2</sup> $\pm$ 1.0	12.3 <sup>1</sup> $\pm$ 1.8
Día 90	9.5 <sup>a</sup> $\pm$ 1.9	10.9 $\pm$ 3.5	6.7 <sup>a</sup> $\pm$ 1.6	8.6 $\pm$ 1.5
Día 180	18.7 <sup>ab</sup> $\pm$ 5.1	15.3 $\pm$ 4.0	12.6 <sup>ab</sup> $\pm$ 2.7	10.7 $\pm$ 1.5
Día 365	19.8 <sup>b</sup> $\pm$ 1.7	17.3 $\pm$ 2.0	16.0 <sup>b</sup> $\pm$ 2.3	12.3 $\pm$ 3.3

<sup>a,b</sup>: Diferentes letras en una misma columna representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

<sup>1,2</sup>: Diferentes números en una misma fila representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

A la vista de los resultados, los perros pueden agruparse en diferentes categorías: por una parte, los machos 5, 6 y 7 no mostraron diferencias significativas en los porcentajes de morfoanomalías, ni dentro de cada protocolo ni entre procedimientos diferentes, con independencia del método valorado (NL vs ULF) o la concentración de glicerol en el diluyente. Otros dos animales, perros 3 y 4, no mostraron diferencias entre protocolos de crioconservación, pero sí se observó que los mayores porcentajes de morfoanomalías se presentaban entre 180 y 365 días de congelación. Finalmente, en los tres machos restantes (1, 2 y 8), se observó una amplia distribución en la presentación de morfoanomalías, puesto que en algunos perros, la mayor frecuencia de morfoanomalías aparecía en las muestras con un 5% de glicerol (perros 1 y 8), mientras que en otro animal (perro 2), la mayor incidencia se observaba en aquellas muestras con mayor concentración de glicerol; el único aspecto relativamente común a estos tres animales es que, dentro de cada protocolo, los valores más elevados se presentaban mayoritariamente en las muestras valoradas tras 6-12 meses de crioconservación.

## 4.2. INDUCCIÓN DEL CELO, CITOLOGÍA VAGINAL, NIVELES PLASMÁTICOS DE PROGESTERONA Y TASA DE FERTILIDAD POST-INSEMINACIÓN

### 4.2.1. Tratamiento de inducción del celo

La tabla 4.41 muestra el nº de días que necesitaron las hembras para presentar signos evidentes de proestro tras el tratamiento de inducción con cabergolina. En todos los casos, los signos de proestro incluyeron la presentación de edema vulvar y descarga vaginal serosanguinolenta. Por tanto, se consideraba que el proestro había comenzado cuando los dos criterios anteriores se presentaban conjuntamente en cada hembra. Las manifestaciones estrales se presentaron como media ( $\pm$  sem) tras  $26.8 \pm 3.9$  días de tratamiento, con un rango que oscilaba entre 13 y 41 días.

Durante la administración del tratamiento los animales no manifestaron ningún tipo de efecto secundario, tal como vómitos o náuseas, o signos de enfermedad sistémica. Asimismo, se observó que una vez instaurados los signos de proestro, la intensidad de la descarga y el edema vulvar manifestaban una progresión dentro de la normalidad.

Tabla 4.41. Nº de días desde el comienzo del tratamiento de inducción con cabergolina hasta la presentación de las manifestaciones de proestro (día=0)

	Identificación de las hembras utilizadas en la experiencia									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Días de tratamiento	13	41	15	24	26	38	19	23	40	29

### 4.2.2. Evolución de la citología vaginal durante el periodo experimental

#### 4.2.2.1. Características de la citología vaginal durante el periodo de inducción del tratamiento

El patrón celular observado en el frotis vaginal el día de inicio del tratamiento era bastante homogéneo entre las hembras empleadas en el estudio (tabla 4.42). Cuando se comenzó a administrar cabergolina, todas las perras presentaban ausencia de células superficiales, mientras el porcentaje de células intermedias grandes era inferior al 20%. En todas las hembras, al menos un 80% de las células que se presentaron en esta primera citología vaginal eran células parabasales e intermedias pequeñas. Por otro lado, salvo en una perra, no se observó presencia de hematíes en el conjunto de los frotis vaginales, mientras que la presencia de neutrófilos en las muestras era variable entre las hembras, siendo su ausencia lo más habitual. Finalmente, el aspecto de la mucosa vaginal era rosado en todos los casos.

Tabla 4.42. Características del frotis vaginal el primer día del tratamiento de inducción del celo

Tipo celular (%)	Identificación de las hembras utilizadas en la experiencia									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Parabasaes	42	39	40	31	70	40	58	80	69	48
Intermedias Pequeñas	39	51	45	68	30	41	42	20	31	52
Intermedias Grandes	19	10	15	1	0	19	0	0	0	0
Superficiales	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hematies	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Neutrófilos	-	+	++	-	-	-	+	-	+++	-
Mucosa Vaginal	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

R: Rosada

El día de inicio del tratamiento (tabla 4.43), el valor medio de células parabasaes observado fue de un 52.0%, el de intermedias pequeñas un 41.5%, el de intermedias grandes 6.5%, no observándose células superficiales. El porcentaje de células presentes en el frotis vaginal fue modificándose conforme avanzaba el tratamiento de inducción; así, entre 12 y 15 días antes del inicio del sangrado (día 0), el porcentaje de células parabasaes ya descendía alrededor de un 30%, mientras que el porcentaje de células intermedias pequeñas mantenía un valor prácticamente constante (50%), y las células intermedias grandes se situaban alrededor del 20%, no detectándose en ningún caso células superficiales. Entre los 9 y 6 días previos al inicio de las manifestaciones esterales, se comprobó que mientras las células intermedias pequeñas apenas mostraban variación en su valor medio (disminuyendo apenas un 5% con respecto a los valores previos) y las células superficiales se encontraban ausentes en todos los frotis, el porcentaje de células intermedias grandes continuaba incrementándose (30-40%), a costa de la disminución progresiva de las células parabasaes (<20%).

Tres días antes del comienzo del sangrado, el nº de células parabasaes había descendido a menos de un 10%, mientras que también se observaba una disminución marcada del porcentaje de células intermedias pequeñas y un incremento manifiesto del porcentaje de intermedias grandes, apareciendo por primera vez las células superficiales, aunque en un bajo número (< 5%). El día del inicio del sangrado (día 0), el valor medio de células parabasaes observado fue de un 4.5%, el de intermedias pequeñas se situaba por debajo del 30%, las

células intermedias grandes seguían manteniendo un valor por encima del 45%, y el porcentaje de superficiales ya se situaba cercano al 20%.

Tabla 4.43. Características del frotis vaginal (media  $\pm$  SEM) desde el tratamiento de inducción hasta el inicio del proestro (día 0 = día del inicio de sangrado vaginal)

Tipo celular (%)	Días con respecto al inicio del sangrado (día 0)						
	IT <sup>1</sup>	-15	-12	-9	-6	-3	0
Parabasales	52.0 $\pm$ 5.6	33.4 $\pm$ 7.2	28.9 $\pm$ 4.9	23.1 $\pm$ 4.8	16.6 $\pm$ 4.7	8.7 $\pm$ 3.2	4.5 $\pm$ 3.2
Intermedias Pequeñas	41.5 $\pm$ 4.6	48.3 $\pm$ 5.5	49.7 $\pm$ 3.4	46.7 $\pm$ 5.6	44.6 $\pm$ 4.6	34.3 $\pm$ 4.4	28.8 $\pm$ 6.5
Intermedias Grandes	6.5 $\pm$ 2.9	18.3 $\pm$ 2.2	21.4 $\pm$ 2.8	30.2 $\pm$ 5.4	38.8 $\pm$ 6.0	53.6 $\pm$ 5.6	46.9 $\pm$ 6.0
Superficiales	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	3.2 $\pm$ 1.4	19.7 $\pm$ 7.1
Hematíes (-/+ + +)	-	-	-	-	-	-	+
Neutrófilos (- - / + + +)	-	-	-	-	-	-	-

<sup>1</sup>: primer día del tratamiento de inducción

#### 4.2.2.2. Características de la citología vaginal durante el periodo de proestro, estro y primeros días del diestro

En la perra 1 (tabla 4.44), se observa que el día de inicio de sangrado ya no se presentaban células parabasales, existiendo una mayoría de células intermedias grandes y en menor medida células superficiales. Conforme se avanzaba en el proestro, se observaron los porcentajes más elevados de células intermedias grandes durante los primeros 5 días, para posteriormente disminuir, presentando el día de la primera inseminación (día 8) un 80% de células superficiales. Durante el periodo de inseminaciones (días 8-11), las células parabasales e intermedias pequeñas se mantenían ausentes del frotis vaginal, mientras el porcentaje de células superficiales se situaba siempre por encima del 80%. Una vez finalizado el periodo de inseminaciones, se detectó una brusca desaparición de las células superficiales; asimismo, las células parabasales e intermedias pequeñas reaparecieron y aumentaron progresivamente en los días posteriores a la inseminación. En esta perra, la duración del proestro y el estro fue de 7 y 5 días, respectivamente.

Por otro lado, durante el periodo del proestro, la mucosa vaginal presentaba una tonalidad entre rosada e hiperémica, para posteriormente pasar a adquirir un aspecto pálido



durante todo el periodo de las inseminaciones; una vez finalizadas, la mucosa volvió a presentar un color rosado.

Tabla 4.44. Características del frotis vaginal desde el inicio del proestro hasta el periodo de post-estro en la perra 1

Tipo Celular (%)	Días con respecto al inicio del sangrado (día 0)																
	0	1	2	3	4	5	6	7	8 <sup>1</sup>	9 <sup>1</sup>	10 <sup>1</sup>	11 <sup>1</sup>	12	14	16	18	
Parabasaes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	12	10	12	
Intermedias Pequeñas	5	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	28	40	42	
Intermedias Grandes	60	62	65	68	58	56	41	20	20	18	20	15	56	50	42	40	
Superficiales	35	33	30	32	42	44	59	80	80	82	80	85	20	10	8	6	
Mucosa vaginal	R	R	H	R	R	R	H	H	P	P	P	P	P	R	R	R	

<sup>1</sup>: Días en los que la hembra fue inseminada. H: Hiperémica; P: Pálida; R: Rosada

En la hembra 2 (tabla 4.45), las células superficiales comenzaron a aparecer 3 días antes del inicio del sangrado, alcanzando un 85% del total de células presentes, tan sólo 3 días tras el comienzo del sangrado. Asimismo, las células parabasaes e intermedias pequeñas desaparecieron rápidamente del frotis vaginal, mientras que el porcentaje de intermedias grandes se situaba por debajo del 20% desde el inicio del proestro. Durante el periodo de inseminaciones, se observó ausencia de células parabasaes e intermedias pequeñas, escaso número de intermedias grandes (<10%) y unos valores de células superficiales superiores al 90%. Finalmente, 3 días (día 13) después de la última inseminación comenzaron a descender el número de células superficiales y a aparecer las primeras células intermedias pequeñas (15%). La mucosa vaginal era rosada el día previo a la primera inseminación, para mantenerse pálida los 4 días siguientes y posteriormente empezar a tornarse ligeramente rosácea. Este animal mostró una duración del proestro de 6 días y de 5 días para el estro.

Tabla 4.45. Características del frotis vaginal desde el inicio del proestro hasta el periodo de post-estro en la perra 2

Tipo Celular (%)	Días con respecto al inicio del sangrado (día 0)														
	0	1	2	3	4	5	6	7 <sup>1</sup>	8 <sup>1</sup>	9 <sup>1</sup>	10 <sup>1</sup>	11	13	15	17
Parabasaes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
Intermedias Pequeñas	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	15	15	15
Intermedias Grandes	21	18	15	17	18	17	5	2	7	7	4	14	15	20	14
Superficiales	75	82	85	83	82	83	95	98	93	93	96	79	70	65	67
Mucosa vaginal	R	R	R	H	R	R	R	P	P	P	P	R	R	R	R

<sup>1</sup>: Días en los que la hembra fue inseminada. H: Hiperémica; P: Pálida; R: Rosada

Con respecto a la hembra 3 (tabla 4.46), durante los primeros días del proestro existía un predominio de células intermedias, mientras las células superficiales no alcanzaron un valor relevante (80%) hasta 7 días tras el inicio del sangrado. Durante el periodo de inseminaciones, no se presentaron ni células parabasaes ni intermedias pequeñas, mientras las células superficiales se mantuvieron elevadas durante todo este periodo (88-92%). No obstante, 4 días después de la última inseminación, las células superficiales empezaron a descender en número a favor de las intermedias grandes y pequeñas, para desaparecer completamente el día 8 post-inseminación, momento en el cual ya se observó un 15% de células parabasaes. La duración del proestro y estro fue de 8 y 4 días, respectivamente.

El aspecto de la mucosa vaginal era completamente pálido durante el periodo de inseminaciones, para una vez finalizado volver a adquirir una tonalidad rosada.

Tabla 4.46. Características del frotis vaginal desde el inicio del proestro hasta el periodo de post-estro en la perra 3

Tipo Celular (%)	Días con respecto al inicio del sangrado (día 0)																
	0	1	2	3	4	5	6	7	8 <sup>1</sup>	9 <sup>1</sup>	10 <sup>1</sup>	11 <sup>1</sup>	13	15	17	19	
Parabasaes	10	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	20	15	
Intermedias Pequeñas	62	20	20	5	15	5	0	0	0	0	0	0	12	20	35	47	
Intermedias Grandes	28	60	31	35	25	40	20	22	10	12	10	8	4	30	35	38	
Superficiales	0	15	49	60	60	55	80	78	90	88	90	92	80	50	10	0	
Mucosa vaginal	R	R	R	H	R	R	R	P	P	P	P	P	R	R	R	R	

<sup>1</sup>: Días en los que la hembra fue inseminada. H: Hiperémica; P: Pálida; R: Rosada

En la hembra 4 (tabla 4.47), dos días tras el inicio de la descarga vaginal empezaron a disminuir las células parabasales en favor de las intermedias, desapareciendo completamente durante el resto del proestro y estro. Las células superficiales se presentaron por primera vez el primer día de sangrado, aumentando rápidamente hasta el día de la primera inseminación (día 7). El porcentaje de células superficiales se mantenía elevado (>85%) durante todo el periodo de inseminaciones, apareciendo un número escaso de células intermedias grandes y encontrándose ausentes las células intermedias pequeñas. Las células intermedias pequeñas comenzaron a reaparecer 2 días después de la última inseminación, mientras que las parabasales no empezaron a presentarse en el frotis hasta 4 días tras la finalización de las inseminaciones. La duración del proestro y estro fue de 7 y 4 días, respectivamente.

El número de hematíes y neutrófilos fue muy variable, pero en general escaso durante todo el periodo estudiado. La mucosa vaginal se mantuvo con un tono pálido a lo largo de todos los días de inseminación.

**Tabla 4.47. Características del frotis vaginal desde el inicio del proestro hasta el periodo de post-estro en la perra 4**

Tipo Celular (%)	Días con respecto al inicio del sangrado (día 0)														
	0	1	2	3	4	5	6	7 <sup>1</sup>	8 <sup>1</sup>	9 <sup>1</sup>	10 <sup>1</sup>	12	14	16	18
Parabasales	5	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	15
Intermedias Pequeñas	20	17	20	10	5	5	2	0	0	0	0	2	10	20	60
Intermedias Grandes	70	70	65	60	45	30	20	15	10	10	15	28	27	60	20
Superficiales	5	10	15	30	50	65	78	85	90	90	85	70	55	20	5
Mucosa vaginal	R	R	R	H	R	R	R	P	P	P	P	P	R	R	R

<sup>1</sup>: Días en los que la hembra fue inseminada. H: Hiperémica; P: Pálida; R: Rosada

La hembra 5 (tabla 4.48) experimentó una fase de proestro de 6 días, y una fase de estro de 5 días. Esta hembra mostraba ausencia de células parabasales e intermedias pequeñas a partir del segundo día del proestro. Desde el comienzo del sangrado, las células superficiales comenzaron a aumentar rápidamente, manteniéndose en un rango elevado (70-86%) hasta el día de la primera inseminación (día 7). Durante el periodo de inseminaciones, la hembra presentaba porcentajes elevados de células superficiales que disminuyeron bruscamente 3 días después de la última inseminación; las células intermedias grandes mostraron valores mínimos

durante todo este periodo. Las células intermedias pequeñas y parabasales se mantuvieron ausentes durante todo el periodo de inseminaciones, comenzando a reaparecer manifiestamente 3 días después de la última inseminación. Por último, una semana tras el final del periodo de inseminaciones, se observaron las células típicas de metaestro (células parabasales con un neutrófilo en el citoplasma).

La tonalidad de la mucosa vaginal variaba entre hiperémica y rosada durante el periodo del proestro, para tornarse pálida durante el periodo del estro y posteriormente volver a mostrar un aspecto rosáceo al final del periodo de inseminación.

**Tabla 4.48. Características del frotis vaginal desde el inicio del proestro hasta el periodo de post-estro en la perra 5**

Tipo Celular (%)	Días con respecto al inicio del sangrado (día 0)														
	0	1	2	3	4	5	6	7 <sup>1</sup>	8 <sup>1</sup>	9 <sup>1</sup>	10 <sup>1</sup>	11	13	15	17
Parabasales	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	27	23
Intermedias Pequeñas	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	50	35	42
Intermedias Grandes	55	30	20	15	14	14	5	5	5	12	14	15	35	30	35
Superficiales	35	70	80	85	86	86	95	95	95	88	86	80	4	8	0
Mucosa vaginal	H	R	H	H	H	R	P	P	P	P	P	R	R	R	R

<sup>1</sup>: Días en los que la hembra fue inseminada. H: Hiperémica; P: Pálida; R: Rosada

En la perra 6 (tabla 4.49), se observó un predominio de células intermedias durante los primeros días del proestro (duración 7 días), mientras las células superficiales comenzaron a incrementarse progresivamente hasta alcanzar un 80%, el octavo día tras el inicio de la descarga vaginal. Las células parabasales y las intermedias pequeñas se encontraban ausentes durante el periodo del estro, reapareciendo de nuevo entre 1 y 7 días después de la última inseminación. El porcentaje de células intermedias grandes osciló entre 15-20% durante el periodo de inseminaciones, para comenzar a aumentar progresivamente tras la finalización del mismo. Por último, las células superficiales alcanzaron un máximo del 85%, comenzando a disminuir marcadamente 3 días después de finalizar las inseminaciones intrauterinas. El periodo de estro de este animal fue de 4 días.

Por otro lado, el número de hematíes presente en el frotis era muy bajo desde el inicio del sangrado hasta la primera inseminación, para posteriormente encontrarse completamente ausentes. El aspecto de la mucosa vaginal fue rosado durante todo el proestro y el primer día del estro, pasando a manifestar una tonalidad pálida que se mantenía incluso varios días tras el periodo de inseminación.

Tabla 4.49. Características del frotis vaginal desde el inicio del proestro hasta el periodo de post-estro en la perra 6

Tipo Celular (%)	Días con respecto al inicio del sangrado (día 0)														
	0	1	2	3	4	5	6	7 <sup>1</sup>	8 <sup>1</sup>	9 <sup>1</sup>	10 <sup>1</sup>	11	13	15	17
Parabasaes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15
Intermedias Pequeñas	35	21	30	13	10	5	0	0	0	0	0	5	15	15	35
Intermedias Grandes	60	50	45	52	55	45	28	20	18	15	15	25	35	60	50
Superficiales	5	29	25	35	35	50	72	80	82	85	85	70	50	25	0
Mucosa vaginal	R	R	R	R	R	R	R	R	R	P	P	P	P	P	R

<sup>1</sup>: Días en los que la hembra fue inseminada. H: Hiperémica; P: Pálida; R: Rosada

En el caso de la perra 7 (tabla 4.50), pocos días antes de comenzar el sangrado, aparecieron las primeras células intermedias grandes en detrimento de las parabasaes; este patrón celular se mantuvo hasta 3 días después del inicio del sangrado, momento en el cual se observaron las primeras células superficiales, que fueron aumentando progresivamente hasta el día de la primera inseminación. Coincidiendo con las inseminaciones, el frotis vaginal mostró ausencia de células parabasaes, que no reaparecieron hasta 8 días después de la última inseminación. Con respecto a las intermedias pequeñas, comenzaron a reaparecer el día de la segunda inseminación, mientras que las intermedias grandes fueron escasas a lo largo de todo el periodo de inseminaciones. Las células predominantes durante todo este periodo fueron las superficiales (>80%), y comenzaron a disminuir progresivamente a partir del segundo día post-inseminación. La duración del proestro fue de 7 días, mientras que la del estro fue de 5.

La mucosa vaginal presentaba una tonalidad rosada durante la primera parte del proestro, para posteriormente adquirir una tonalidad hiperémica. El primer día de inseminación, la mucosa mostraba una coloración pálida, para finalmente, en diestro, volver a mostrar la típica tonalidad rosada de la mucosa vaginal.

Tabla 4.50. Características del frotis vaginal desde el inicio del proestro hasta el periodo de post-estro en la perra 7

Tipo Celular (%)	Días con respecto al inicio del sangrado (día 0)																
	0	1	2	3	4	5	6	7	8 <sup>1</sup>	9 <sup>1</sup>	10 <sup>1</sup>	11 <sup>1</sup>	13	15	17	19	
Parabasales	30	15	10	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	
Intermedias Pequeñas	50	61	50	45	25	19	5	0	0	5	5	10	5	10	10	30	
Intermedias Grandes	20	24	40	45	65	52	20	20	16	10	10	10	40	61	80	60	
Superficiales	0	0	0	5	10	29	75	80	84	85	85	80	55	29	10	5	
Mucosa vaginal	R	R	R	R	H	H	H	H	P	P	P	P	R	R	R	R	

<sup>1</sup>: Días en los que la hembra fue inseminada. H: Hiperémica; P: Pálida; R: Rosada

La perra 8 (tabla 4.51) presentaba una mayoría de células intermedias durante los primeros días del proestro, disminuyendo progresivamente hasta el inicio del estro. Durante el periodo de inseminaciones, esta hembra presentaba una ausencia total de células parabasales e intermedias pequeñas, mientras las células intermedias grandes se mantuvieron en un rango de 10-15%, aumentando ligeramente tras la última inseminación. En el estro, las células predominantes fueron las superficiales, comenzando a disminuir 2 días tras el final del periodo de inseminaciones, para desaparecer completamente 15 días después del inicio del sangrado. En este animal, el proestro y estro tuvieron una duración de 6 y 4 días, respectivamente.

Por otro lado, en el frotis de esta hembra se observaron células típicas de metaestro (células parabasales con un neutrófilo en el citoplasma) y células espumosas (células parabasales con vacuolas en el citoplasma) entre 4 y 6 días de finalizadas las inseminaciones. Asimismo, la presencia de hematíes en el frotis fue evidente cuando comenzó la descarga vulvar, disminuyendo su presencia al comenzar las inseminaciones. La mucosa vaginal se tornó hiperémica durante todo el proestro hasta la primera inseminación, pasando luego a un tono pálido y finalmente volvió a adquirir el aspecto rosado propio de la mucosa vaginal.

Tabla 4.51. Características del frotis vaginal desde el inicio del sangrado vaginal hasta el periodo de post-estro en la perra 8

Tipo Celular (%)	Días con respecto al inicio del sangrado (día 0)													
	0	1	2	3	4	5	6	7 <sup>1</sup>	8 <sup>1</sup>	9 <sup>1</sup>	11	13	15	17
Parabasaes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	10	30
Intermedias Pequeñas	25	21	10	0	0	0	0	0	0	0	4	10	30	50
Intermedias Grandes	43	50	52	60	22	21	15	15	12	10	25	30	60	20
Superficiales	32	29	38	40	78	79	85	85	88	90	69	60	0	0
Mucosa vaginal	R	H	H	H	H	H	H	P	P	P	P	R	R	R

<sup>1</sup>: Días en los que la hembra fue inseminada. H: Hiperémica; P: Pálida; R: Rosada

En la hembra 9 (tabla 4.52), las células parabasaes se encontraban ausentes durante todo el periodo de proestro y estro (duración de 6 y 5 días, respectivamente), mientras las células intermedias pequeñas sólo se presentaron en los primeros días del proestro. Las células superficiales aumentaron progresivamente hasta alcanzar un 90% el primer día de inseminación. Durante esta fase de inseminaciones, el tipo celular predominante fueron las células superficiales, para comenzar a descender el último día de inseminación. Las células parabasaes e intermedias comenzaron a reaparecer y aumentar progresivamente 2 días tras el final del periodo de inseminaciones.

Durante todo este periodo, la mucosa vaginal mostró una tonalidad rosada; sólo adquirió tonalidad pálida en la segunda mitad del estro.

Tabla 4.52. Características del frotis vaginal desde el inicio del sangrado vaginal hasta el periodo de post-estro en la perra 9

Tipo Celular (%)	Días con respecto al inicio del sangrado (día 0)														
	0	1	2	3	4	5	6	7 <sup>1</sup>	8 <sup>1</sup>	9 <sup>1</sup>	10 <sup>1</sup>	12	14	16	18
Parabasaes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	10	10	20
Intermedias Pequeñas	40	15	5	0	0	0	0	0	0	0	0	5	30	35	40
Intermedias Grandes	50	60	45	30	23	20	17	10	10	15	20	60	50	50	40
Superficiales	10	25	50	70	77	80	83	90	90	85	80	30	10	5	0
Mucosa vaginal	R	R	R	R	R	R	R	R	P	P	P	R	R	R	R

<sup>1</sup>: Días en los que la hembra fue inseminada. H: Hiperémica; P: Pálida; R: Rosada

La perra 10 (tabla 4.53) presentó una gran mayoría de células intermedias los primeros tres días del proestro, pero a partir del 4º día, las células superficiales aumentaron bruscamente hasta alcanzar un 95% el día de la primera inseminación. Durante el periodo de inseminaciones existía un claro predominio de las células superficiales, mientras las células parabasales e intermedias pequeñas no se observaron en el frotis vaginal; con respecto a las células intermedias grandes, su presencia fue escasa pero constante (rango: 3-11%). Las células intermedias pequeñas comenzaron a reaparecer 1 día tras el final de las inseminaciones, mientras las parabasales reaparecieron en mayor número, coincidiendo con la desaparición en el frotis de las células superficiales. La duración del proestro y estro fue de 6 y 5 días, respectivamente.

Los hematíes se presentaron en un nº elevado en los primeros días del proestro. La mucosa vaginal varió desde una tonalidad hiperémica, en la mayor parte del proestro, hasta presentar una tonalidad pálida en el periodo de inseminaciones.

Tabla 4.53. Características del frotis vaginal desde el inicio del sangrado vaginal hasta el periodo de post-estro en la perra 10

Tipo Celular (%)	Días con respecto al inicio del sangrado (día 0)															
	0	1	2	3	4	5	6	7 <sup>1</sup>	8 <sup>1</sup>	9 <sup>1</sup>	10 <sup>1</sup>	11	13	15	17	
Parabasales	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	8	5	20	
Intermedias Pequeñas	38	20	9	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4	14	39	
Intermedias Grandes	62	65	68	22	22	20	11	5	4	4	3	15	14	21	41	
Superficiales	0	15	23	78	78	80	89	95	96	96	97	77	74	60	0	
Mucosa vaginal	H	H	H	H	H	P	P	P	P	P	P	P	R	R	R	

<sup>1</sup>: Días en los que la hembra fue inseminada. H: Hiperémica; P: Pálida; R: Rosada

Finalmente, la duración media del proestro y estro en la totalidad de los animales inducidos se situó en  $6.7 \pm 0.3$  y  $4.6 \pm 0.2$  días, respectivamente.



#### 4.2.3. Niveles plasmáticos de progesterona durante el tratamiento de inducción, proestro, estro y diestro inducidos

La tabla 4.54 y las figuras 4.33 a 4.42 muestran los niveles plasmáticos de progesterona de cada una de las hembras, durante todo el periodo experimental. El día de inicio de tratamiento, todas las perras mostraban unos valores netamente basales, con un valor medio ( $\pm$  SEM) de  $0.16 \pm 0.02$  ng/mL. Del mismo modo, los niveles plasmáticos de progesterona durante todo el periodo de inducción se situaban siempre por debajo de 0.6 ng/mL, distribuyéndose de manera muy similar entre las diferentes hembras.

Durante el periodo del proestro, la totalidad de las hembras experimentaron un incremento de las concentraciones plasmáticas de progesterona, situándose en la mayoría de las perras (hembras 1, 2, 3, 5, 7, 8 y 9) por encima de los 0.7 ng/mL después de 3-4 días de iniciarse la descarga vaginal, y mostrando un valor medio ( $\pm$  SEM) de  $1.4 \pm 0.2$  ng/mL, tras 6 días de comenzado el sangrado. Asimismo, el último día de proestro los niveles medios de progesterona se situaron en 1.7 ng/mL, con oscilaciones evidentes entre las hembras (rango: 0.9-2.9 ng/mL).

Durante el periodo de inseminaciones, se observaron notables variaciones entre las hembras: en algunos animales (hembras 7 y 9), los valores más elevados de progesterona se situaron alrededor de los 5 ng/mL, mientras que en otras dos perras (hembras 2 y 8), las concentraciones de progesterona alcanzaron valores entre 5.5 y 8 ng/mL. El resto de las hembras presentaron valores relativamente elevados de progesterona durante el periodo de estro, con niveles superiores a 9-10 ng/mL en el último día de inseminación.

Tras el periodo de celo, a excepción de la perra 7, en el resto de las hembras, se detectó un evidente incremento de las concentraciones plasmáticas de progesterona, tan sólo 4 días tras el final del periodo de inseminaciones. Entre 7 y 8 días después de finalizar el periodo de celo, el valor medio ( $\pm$  SEM) de progesterona plasmática se situó en  $39.0 \pm 3.1$  ng/mL (rango: 22.3-50.2 ng/mL).

Figura 4.33. Niveles plasmáticos de progesterona en la perra 1, desde el inicio del tratamiento de inducción (IT) hasta después del periodo de inseminaciones. Periodo de inseminaciones señalado con rectángulo rojo.

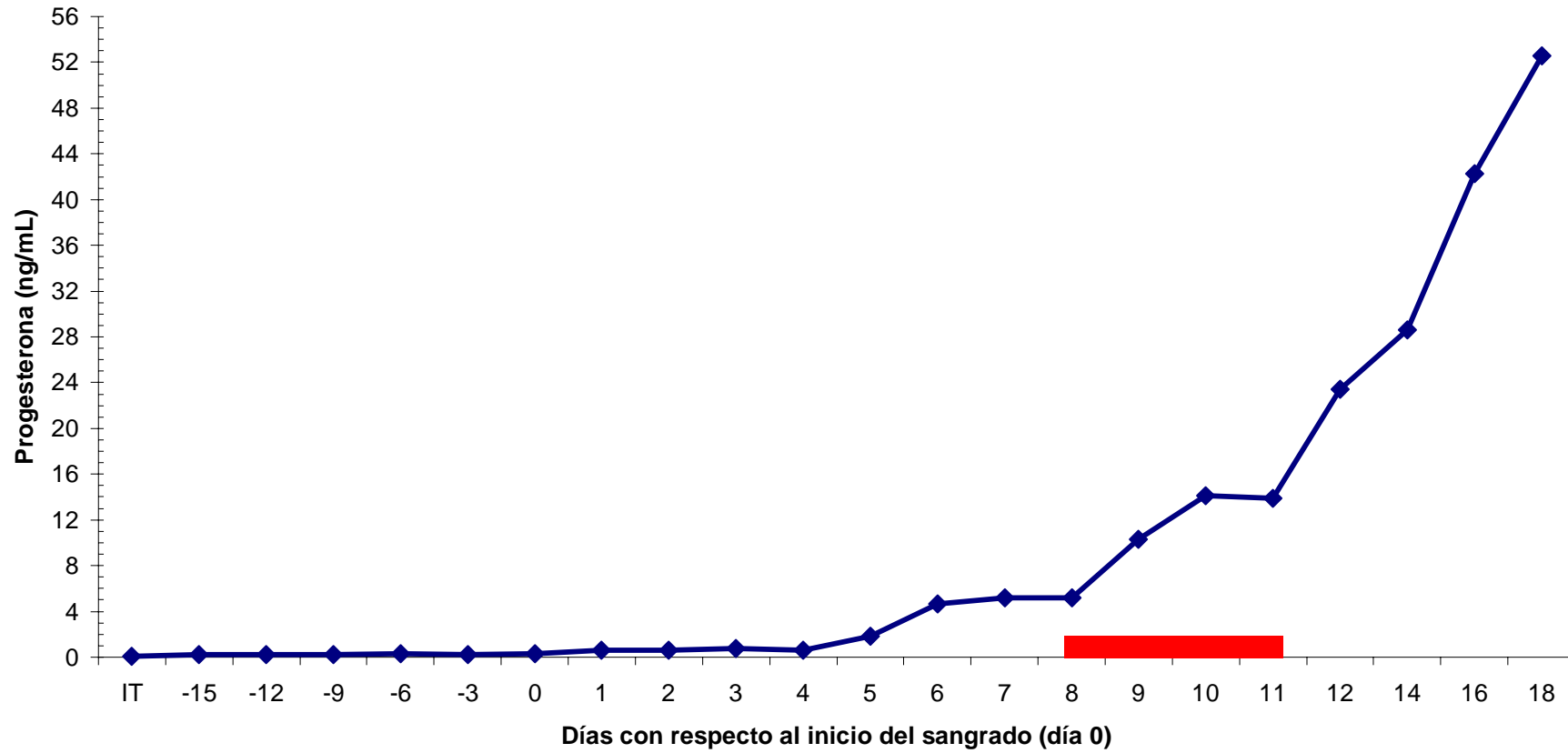


Figura 4.34. Niveles plasmáticos de progesterona en la perra 2, desde el inicio del tratamiento de inducción (IT) hasta después del periodo de inseminaciones. Periodo de inseminaciones señalado con rectángulo rojo.

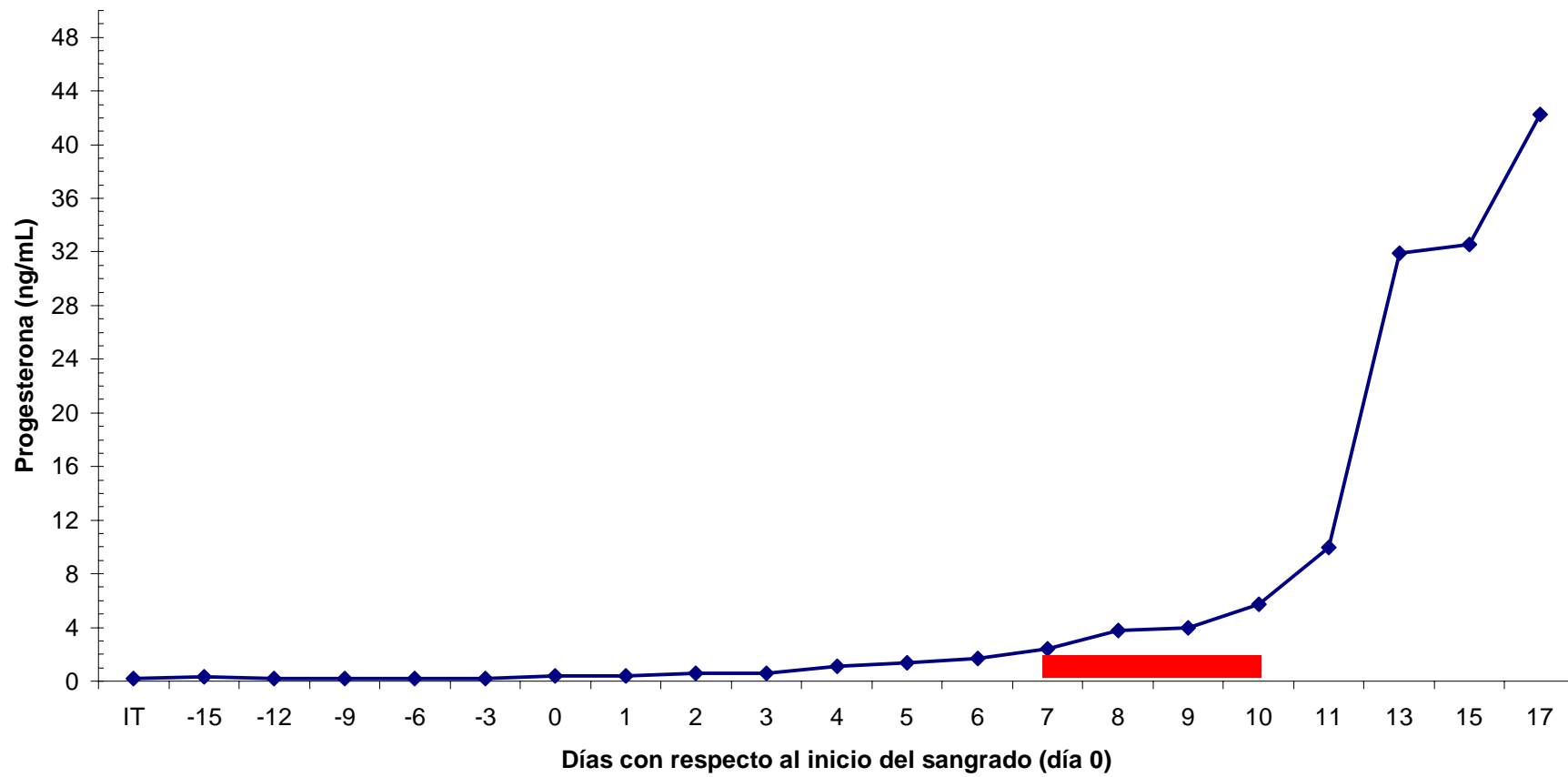


Figura 4.35. Niveles plasmáticos de progesterona en la perra 3, desde el inicio del tratamiento de inducción (IT) hasta después del periodo de inseminaciones. Periodo de inseminaciones señalado con rectángulo rojo.

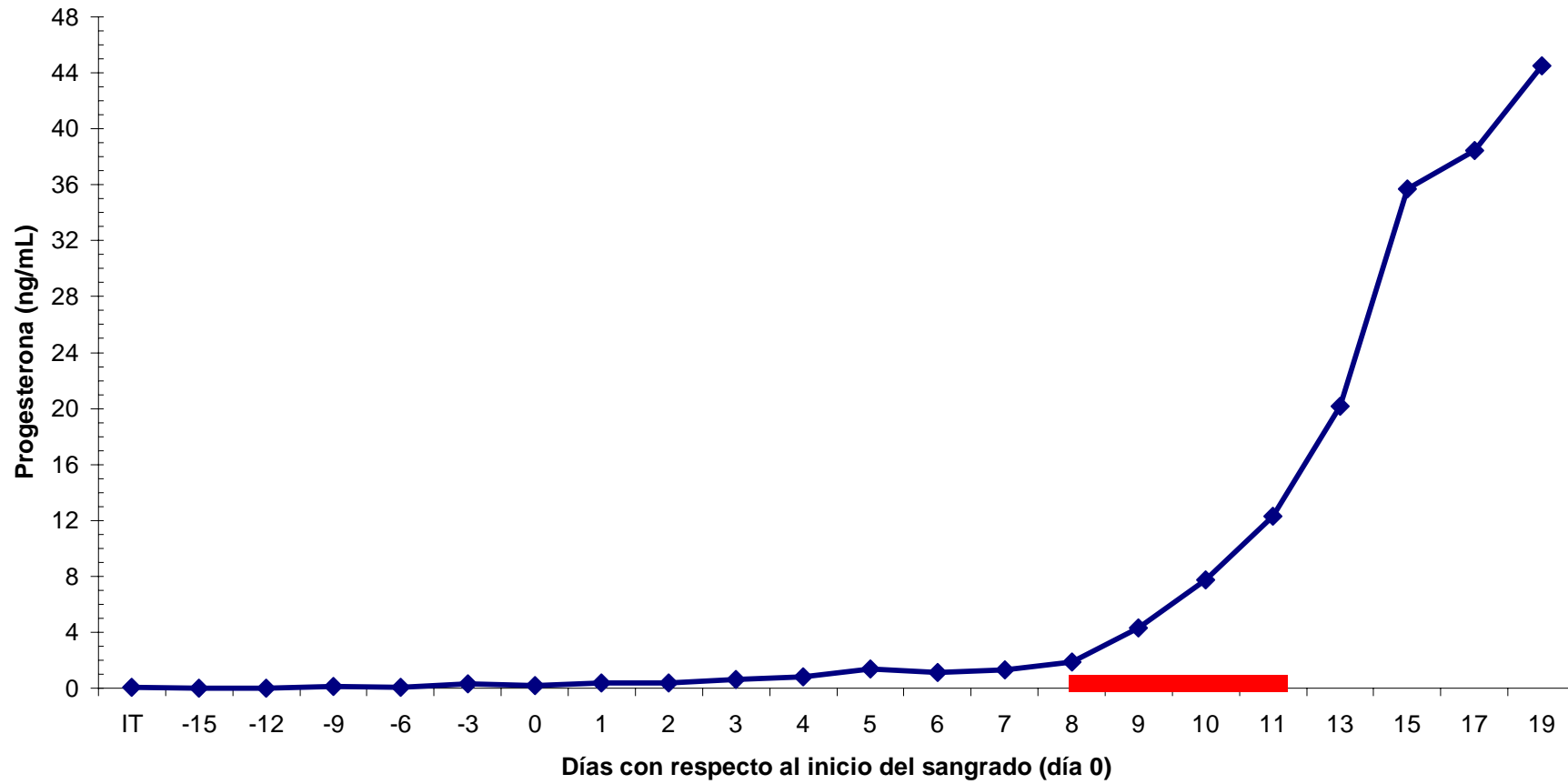


Figura 4.36. Niveles plasmáticos de progesterona en la perra 4, desde el inicio del tratamiento de inducción (IT) hasta después del periodo de inseminaciones. Periodo de inseminaciones señalado con rectángulo rojo.

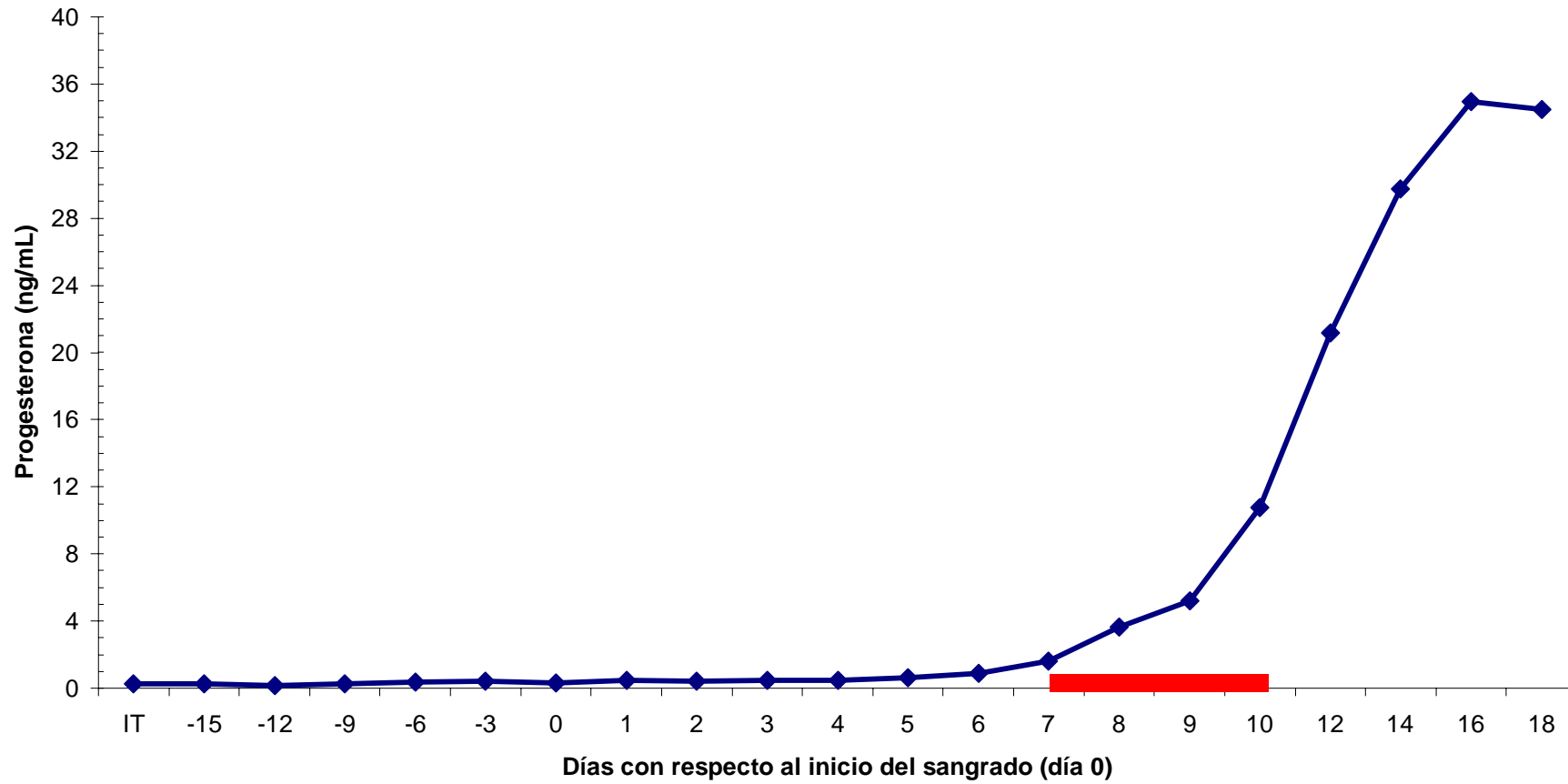


Figura 4.37. Niveles plasmáticos de progesterona en la perra 5, desde el inicio del tratamiento de inducción (IT) hasta después del periodo de inseminaciones. Periodo de inseminaciones señalado con rectángulo rojo.

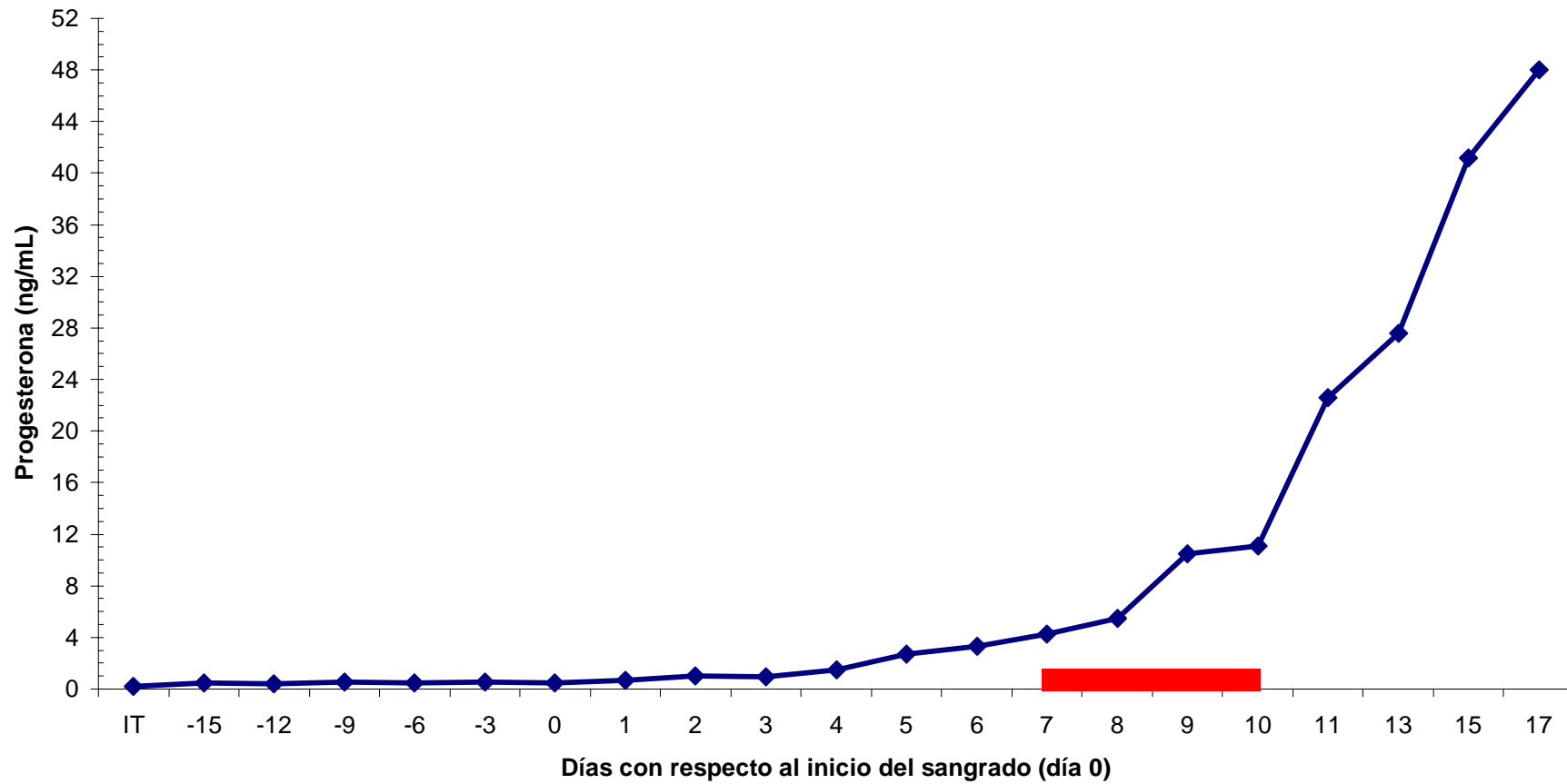


Figura 4.39. Niveles plasmáticos de progesterona en la perra 7, desde el inicio del tratamiento de inducción (IT) hasta después del periodo de inseminaciones. Periodo de inseminaciones señalado con rectángulo rojo.

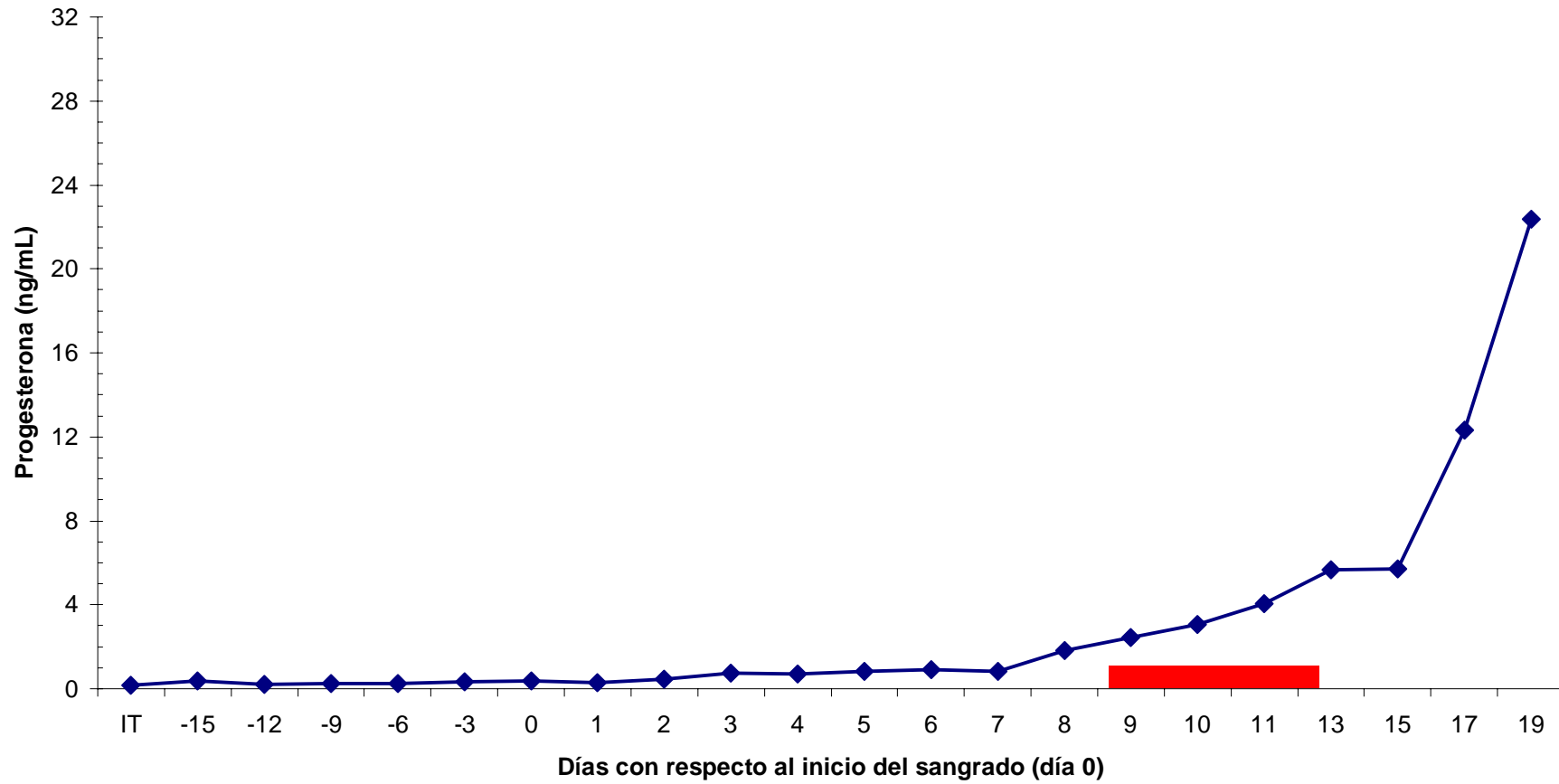


Figura 4.38. Niveles plasmáticos de progesterona en la perra 6, desde el inicio del tratamiento de inducción (IT) hasta después del periodo de inseminaciones. Periodo de inseminaciones señalado con rectángulo rojo.

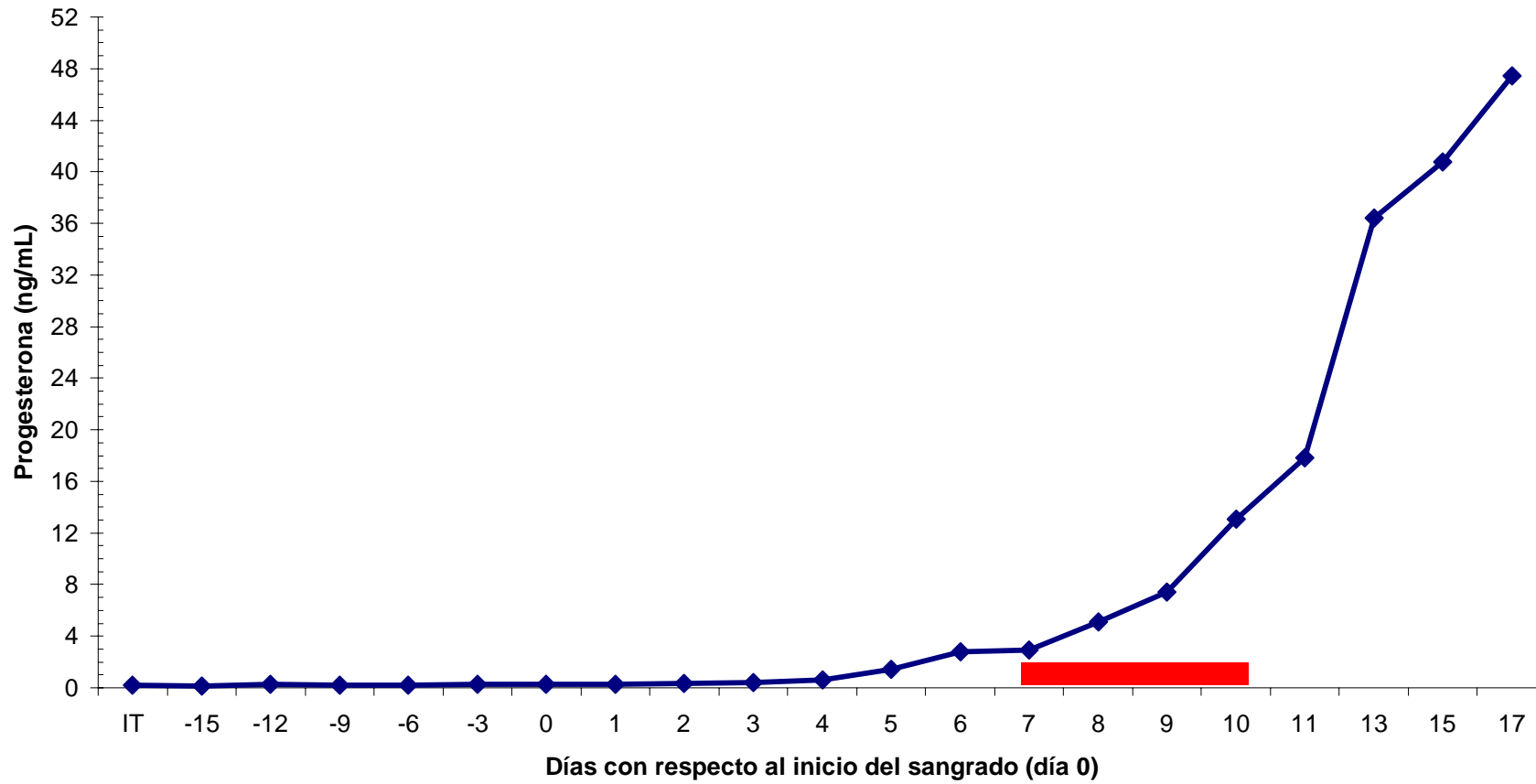




Figura 4.40. Niveles plasmáticos de progesterona en la perra 8, desde el inicio del tratamiento de inducción (IT) hasta después del periodo de inseminaciones. Periodo de inseminaciones señalado con rectángulo rojo.

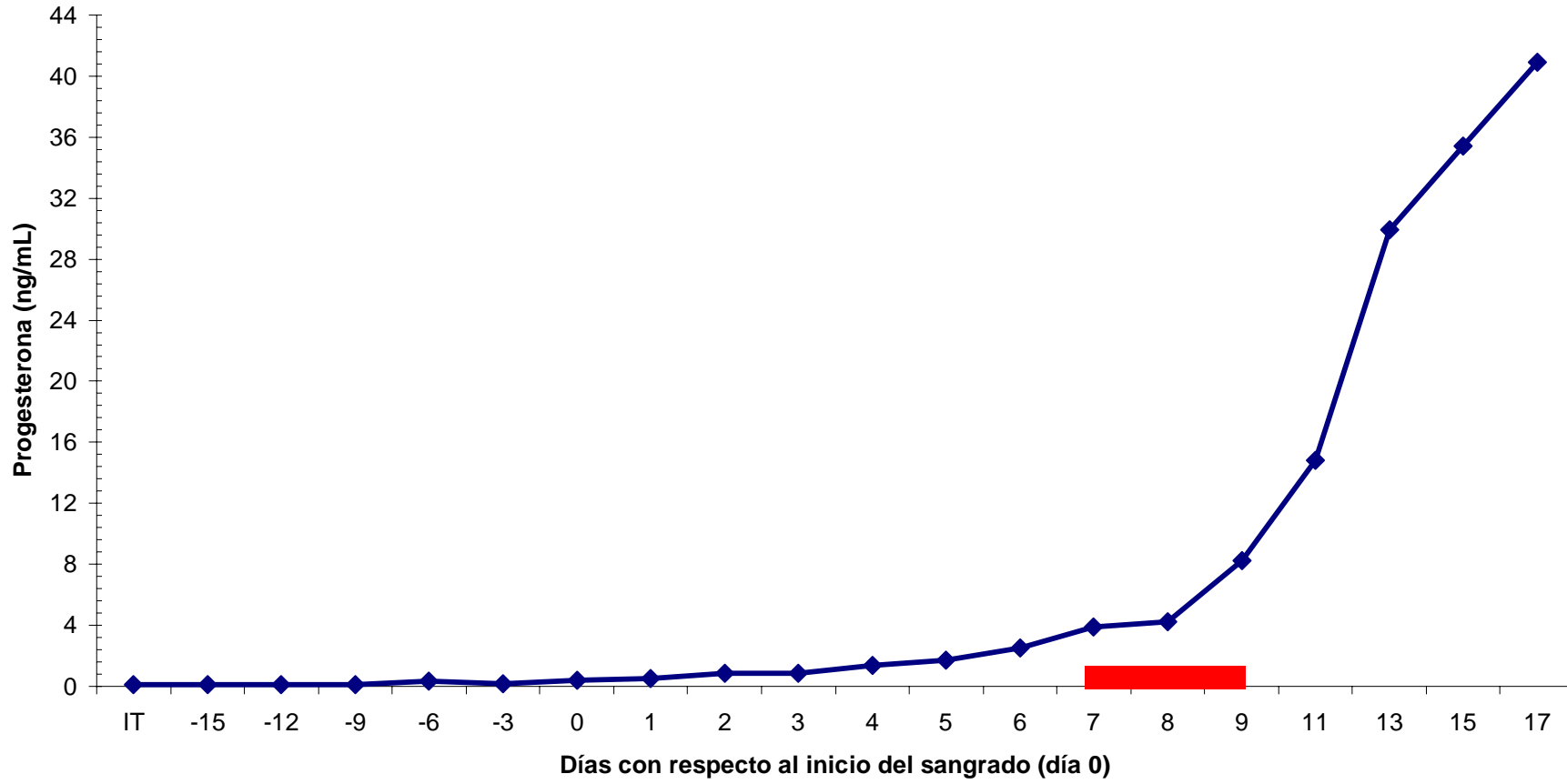


Figura 4.41. Niveles plasmáticos de progesterona en la perra 9, desde el inicio del tratamiento de inducción (IT) hasta después del periodo de inseminaciones. Periodo de inseminaciones señalado con rectángulo rojo.

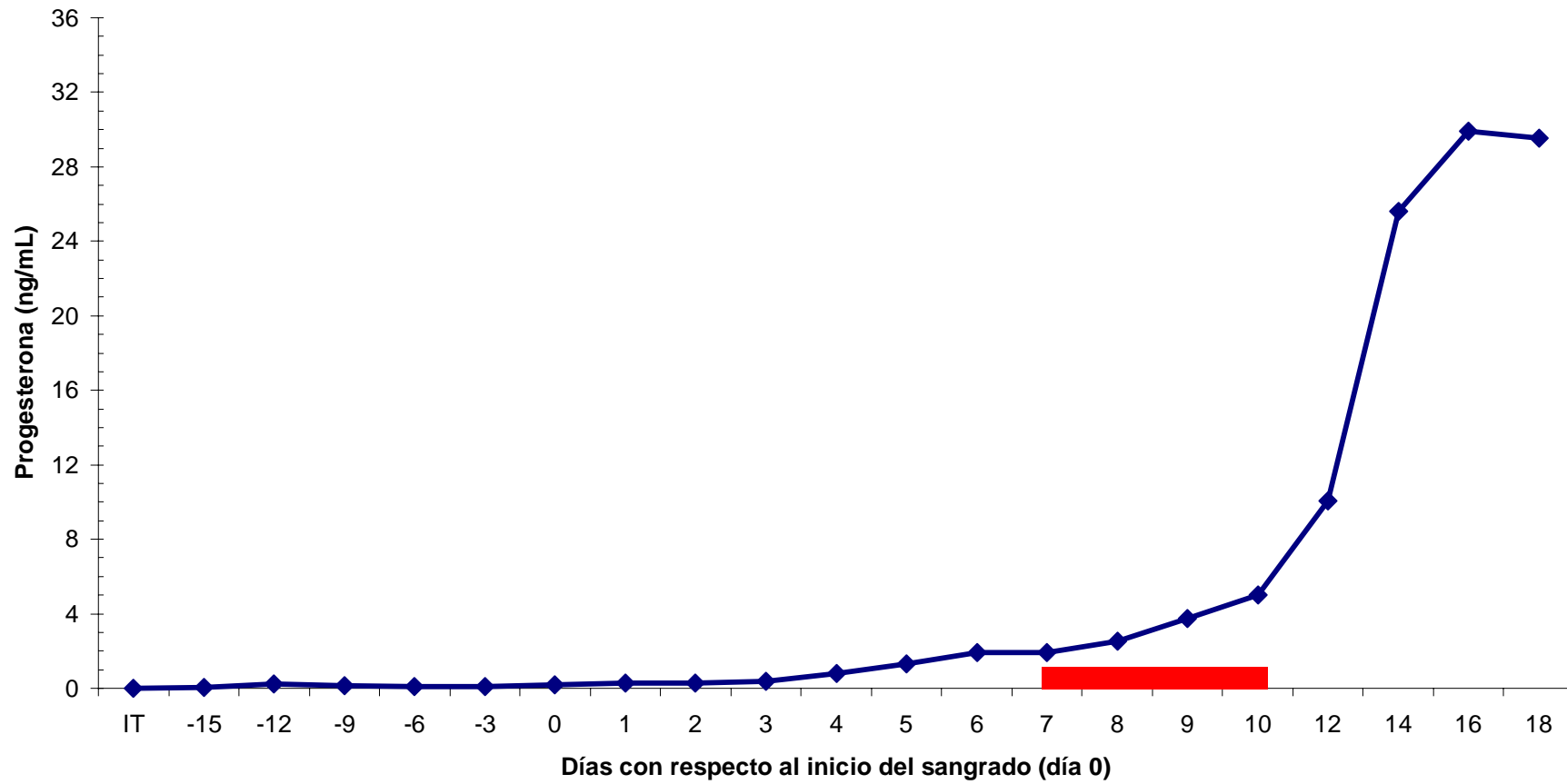
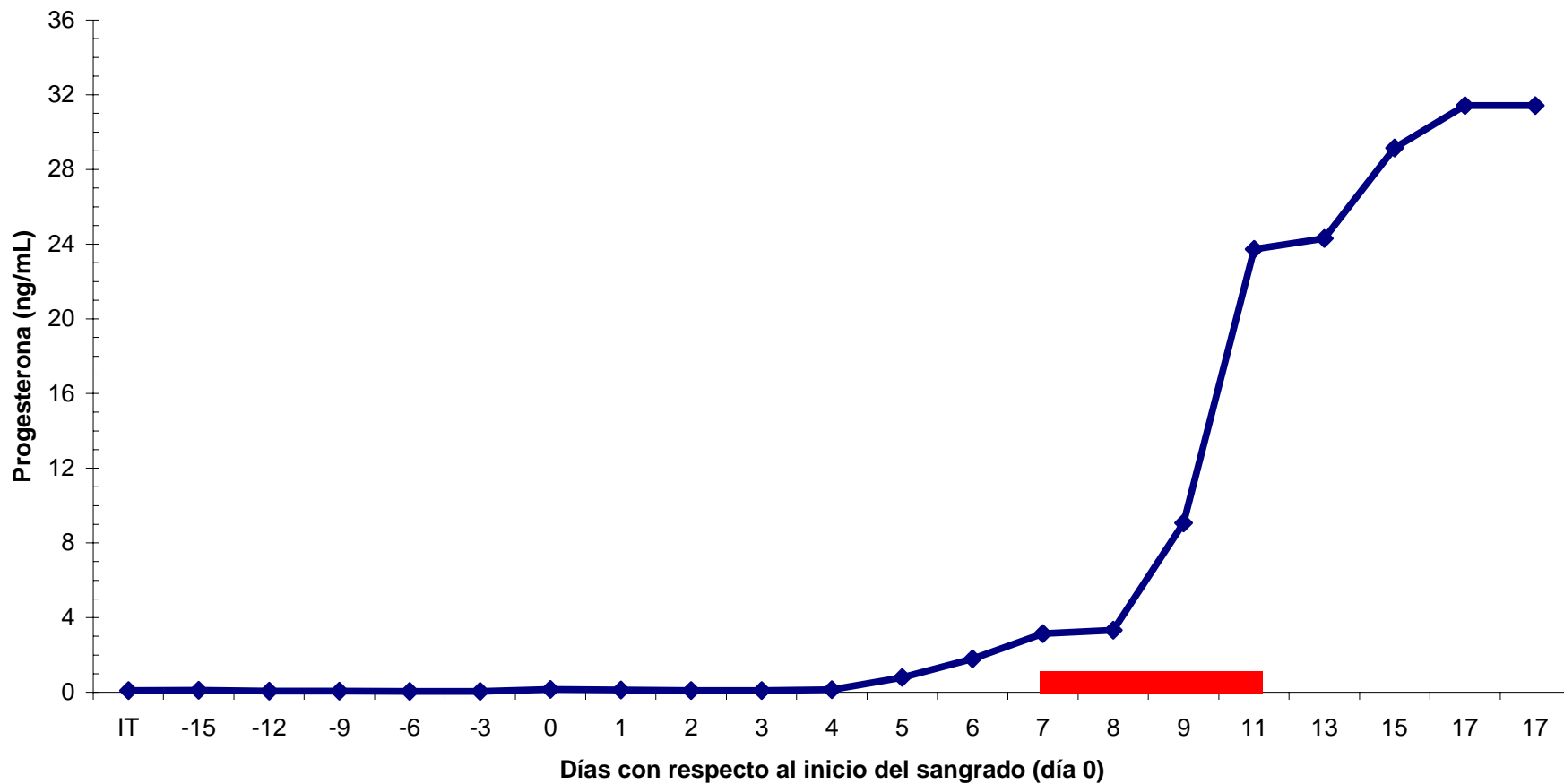


Figura 4.42. Niveles plasmáticos de progesterona en la perra 10, desde el inicio del tratamiento de inducción (IT) hasta después del periodo de inseminaciones. Periodo de inseminaciones señalado con rectángulo rojo.



**Tabla 4.54. Niveles plasmáticos de progesterona (ng/mL) durante el tratamiento de inducción, proestro, estro y tras el periodo de inseminaciones**

Identificación	Días con respecto al inicio del sangrado (día 0)																									
	IT <sup>1</sup>	-15	-12	-9	-6	-3	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Perra 1	0.11	0.22	0.20	0.26	0.33	0.21	0.29	0.60	0.60	0.76	0.82	1.90	2.95	5.17	5.20	10.3	14.1	13.9	23.5	28.6	42.3	50.2				
Perra 2	0.18	0.29	0.19	0.20	0.19	0.17	0.36	0.39	0.59	0.61	1.14	1.40	1.70	2.41	3.79	3.99	5.76	9.95	31.9	32.5	42.2					
Perra 3	0.10	0.10	0.15	0.14	0.10	0.17	0.33	0.37	0.39	0.65	0.80	1.40	1.14	1.33	1.89	4.32	7.75	12.3	20.1	35.7	38.4	44.5				
Perra 4	0.25	0.26	0.20	0.28	0.38	0.44	0.40	0.45	0.42	0.49	0.45	0.60	0.87	1.60	3.65	5.18	10.8	21.2	29.7	34.9	34.5					
Perra 5	0.20	0.45	0.42	0.57	0.48	0.46	0.50	0.71	1.04	0.95	1.46	2.70	3.30	4.26	5.50	10.5	11.1	22.6	27.6	41.2	48.0					
Perra 6	0.18	0.15	0.29	0.20	0.17	0.30	0.24	0.30	0.34	0.42	0.62	1.40	2.80	2.95	5.11	7.41	13.1	17.8	36.4	40.8	47.0					
Perra 7	0.15	0.29	0.31	0.27	0.25	0.31	0.36	0.30	0.47	0.75	0.70	0.80	0.90	0.81	1.80	2.44	3.10	4.04	4.80	5.66	5.72	12.3	22.3			
Perra 8	0.14	0.13	0.14	0.11	0.33	0.16	0.40	0.51	0.85	0.85	1.35	1.70	2.54	3.89	4.23	8.25	14.8	29.9	35.4	40.9						
Perra 9	0.10	0.11	0.21	0.14	0.10	0.11	0.21	0.29	0.27	0.39	0.80	1.30	1.90	1.90	2.55	3.75	5.10	10.0	25.6	29.9	29.5					
Perra 10	0.10	0.10	0.09	0.10	0.08	0.12	0.15	0.13	0.10	0.11	0.32	0.90	1.80	3.14	3.33	6.00	9.10	23.7	24.3	29.2	31.4					

<sup>1</sup>: Primer día del tratamiento de inducción; <sup>2</sup>: Cifras señaladas en rojo indican periodo de inseminaciones

#### 4.2.4. Calidad del semen post-descongelación y procedimiento de inseminación

La tabla 4.55 muestra las características del semen crioconservado, evaluado 5 minutos tras su descongelación, en ambos procedimientos de congelación. No se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros evaluados, siendo los resultados muy homogéneos dentro de cada protocolo y entre protocolos. Cada hembra (excepto la perra 8) recibió 8 pajuelas (2 dosis/día de inseminación) y un total de  $400 \times 10^6$  espermatozoides durante el periodo de inseminaciones; la hembra 8 se inseminó durante tres días consecutivos, aplicando un total de  $100 \times 10^6$  espermatozoides/día.

Tabla 4.55. Características del semen descongelado tras ser crioconservado con nitrógeno líquido y ultracongelador de  $-152\text{ }^{\circ}\text{C}$  (media  $\pm$  SEM)

Parámetros valorados	Protocolo de crioconservación empleado	
	Ultracongelador de $-152\text{ }^{\circ}\text{C}$	Nitrógeno Líquido
Motilidad individual progresiva	$58.2 \pm 1.0$	$59.0 \pm 2.2$
Vitalidad espermática	$66.3 \pm 4.4$	$69.9 \pm 3.4$
Morfoanomalías	$12.2 \pm 3.5$	$11.7 \pm 4.5$
Acrosomías	$8.6 \pm 1.1$	$9.3 \pm 1.6$

El procedimiento de inseminación fue efectivo en todos los animales. El cuello del útero se localizó con facilidad en todas las hembras, y la progresión del catéter de inseminación fue perfectamente monitorizada en la totalidad de las perras. Dos de las hembras (perras 2 y 5) presentaron cierta dificultad a la progresión del catéter de inseminación a través del canal cervical, pero en ambos casos, finalmente se consiguió atravesar el cuello uterino en un plazo inferior a 1 minuto. Una vez realizada la inseminación, puntualmente se observó la existencia de reflujo de la dilución seminal (perras 2, 4 y 5), y no en todos los días que fueron inseminadas; en cualquier caso, el volumen de reflujo nunca fue superior al 50% del inseminado.

#### 4.2.5. Tasa de fertilidad y tamaño de la camada

El diagnóstico de gestación realizado entre 26 y 28 días tras la última inseminación, determinó que 4 de las 10 hembras se habían quedado gestantes: 2 animales habían sido inseminadas con semen criopreservado en ultracongelador de  $-152\text{ }^{\circ}\text{C}$  y otras dos hembras, con semen criopreservado con nitrógeno líquido (tabla 4.56). El examen ecográfico de las hembras gestantes confirmó la existencia de viabilidad fetal, buena implantación placentaria y la ausencia de patologías que pudiesen comprometer la progresión de la gestación. En las hembras no gestantes, tampoco se detectaron signos indicativos de alteraciones uterinas u ováricas.

Las cuatro hembras gestantes concluyeron la gestación con éxito, con una duración prácticamente similar en todos los casos (57-59 días tras la última inseminación). En el momento del parto, 3 perras tuvieron partos eutócicos, sin complicaciones; la hembra restante (perra 7) comenzó un parto normal, pero precisó de ayuda veterinaria para completarlo. El nº de cachorros (tabla 4.56) fue diferente entre las hembras, si bien no se detectaron diferencias en función de la técnica de criopreservación utilizada (4.5 y 4.0 cachorros, en nitrógeno líquido *versus* ultracongelador de  $-152\text{ }^{\circ}\text{C}$ , respectivamente). Todos los cachorros sobrevivieron, no manifestaron anomalías congénitas, enfermedades sistémicas o cualquier otro signo de patología evidente. Dos meses tras el parto, el peso, rango de crecimiento y vitalidad eran completamente similares entre todos los cachorros.

Tabla 4.56. Tasa de fertilidad, duración de la gestación y tamaño de la camada tras inseminación con semen criopreservado por diferentes procedimientos técnicos

	Protocolo de criopreservación empleado									
	Ultracongelador de $-152\text{ }^{\circ}\text{C}$					Nitrógeno Líquido				
Identificación de las hembras	1	3	5	7	9	2	4	6	8	10
Gestación	SI	NO	NO	SI	NO	NO	NO	NO	SI	SI
Duración de la gestación (días)	59	-	-	57	-	-	-	-	58	59
Tamaño de la camada	2	-	-	6	-	-	-	-	4	5

#### 4.2.6. Relación entre citología vaginal, niveles plasmáticos de progesterona, tasa de fertilidad y prolificidad

La tabla 4.57 define el porcentaje medio de células presentes en el frotis vaginal, el aspecto general de la mucosa vaginal y las concentraciones plasmáticas medias de progesterona en cada uno de los animales, durante el periodo de inseminaciones. Asimismo, se detallan la tasa de fertilidad y el tamaño de la camada tras el procedimiento de inseminación artificial.

No existía una correlación definida entre el porcentaje de células superficiales presentes en el frotis vaginal y los niveles plasmáticos de progesterona, durante el periodo de inseminaciones. Las hembras (perras 1, 6 y 7) que presentaron un menor porcentaje medio de células superficiales en el frotis vaginal, exhibieron diferencias en las concentraciones medias de progesterona; del mismo modo, las hembras que mostraron los mayores porcentajes de células superficiales, también presentaron falta de uniformidad en los valores medios de progesterona plasmática.

Por otro lado, entre las hembras que quedaron gestantes, se observaron diferencias evidentes en las concentraciones medias (y también en los valores absolutos) de progesterona plasmática durante el periodo del celo; un comportamiento similar se detectó en referencia al frotis vaginal, donde se mostraron porcentajes de células superficiales que oscilaban desde un 80% a un 97%.

Finalmente, la prolificidad más elevada se obtuvo en la perra 7, que presentó una concentración plasmática de progesterona de las más bajas, mientras que el animal (perra 1) que tuvo la menor prolificidad, mostró los valores más elevados de progesterona plasmática. Los porcentajes de células superficiales no fueron significativamente diferentes entre las dos hembras que presentaron mayor diferencia en el tamaño de la camada ( $81.7 \pm 1.4$  vs  $83.5 \pm 1.4$ ; hembra 1 vs hembra 7, respectivamente).

Tabla 4.57. Citología vaginal, niveles plasmáticos de progesterona durante el periodo de inseminaciones y tasa de gestación y prolificidad tras inseminación con semen crioconservado por diferentes protocolos técnicos

	Protocolo de crioconservación empleado									
	Ultracongelador de - 152 °C					Nitrógeno Líquido				
Identificación de las hembras	1	3	5	7	9	2	4	6	8	10
Células superficiales (%) en el frotis vaginal <sup>1</sup>	81.7 ± 1.4 (80-85%)	90.0 ± 0.9 (88-92%)	91.0 ± 2.7 (86-95%)	83.5 ± 1.3 (80-85%)	86.2 ± 2.8 (80-90%)	95.5 ± 1.2 (93-98%)	87.5 ± 1.7 (85-90%)	83.0 ± 1.4 (80-85%)	87.0 ± 1.4 (85-90%)	94.2 ± 2.1 (89-97%)
Aspecto general de la mucosa vaginal <sup>2</sup>	P	P	P	P	R-P	P	P	H-P	P	P
Progesterona (ng/mL) <sup>3</sup>	10.9 ± 2.4 (5.2-14.1)	6.6 ± 2.6 (1.9-12.3)	7.8 ± 2.0 (4.3-11.1)	3.6 ± 0.8 (2.4-4.8)	3.3 ± 0.8 (1.9-5.1)	3.9 ± 0.8 (2.4-5.8)	5.3 ± 2.3 (1.6-10.8)	7.2 ± 2.5 (2.9-13.1)	4.7 ± 1.4 (2.5-8.2)	5.4 ± 1.6 (3.1-9.1)
Gestación	SI	-	-	SI	-	-	-	-	SI	SI
Tamaño de la camada	2	-	-	6	-	-	-	-	4	5

<sup>1</sup>Células superficiales: media ± SEM <sup>2</sup>Aspecto de la mucosa vaginal: H: Hiperémica; P: Pálida; R: Rosada. <sup>3</sup>Progesterona: media ± SEM



## 5. DISCUSION

## 5. DISCUSION

### 5.1. CALIDAD SEMINAL IN VITRO

#### 5.1.1. Características seminales en fresco

En el semen fresco, las características seminales macroscópicas y microscópicas mostraron ligeras variaciones entre individuos, pero generalmente se mantuvieron bastante homogéneas dentro del mismo animal.

El volumen eyaculado (2ª fracción) mostraba una importante variabilidad (rango: 0.9-3.8 mL) entre los diferentes animales, si bien los resultados obtenidos fueron similares a los descritos por otros autores (Burke, 1986; Concannon y cols., 1993; England, 1999; Iguer-ouada, 2001). Asimismo, dentro de cada individuo, el volumen aportado fue bastante homogéneo en todas las recogidas efectuadas. Resulta ampliamente aceptado que el rango de volumen de semen eyaculado obtenido en los diferentes estudios puede ser consecuencia de numerosos factores: raza, edad, ritmo de recogida, etc... (Concannon y cols., 1993; England, 1999), si bien queda fuera de toda duda, que la razón principal de las oscilaciones parece ser la variabilidad individual propia de cada ejemplar.

Con referencia a la motilidad individual progresiva, los valores se mantuvieron más constantes, no existiendo grandes variaciones entre individuos. Estos valores se encuadran dentro de los descritos por otros autores; así, hay estudios que describen resultados más bajos de motilidad (valor medio: 69.4%; England, 1999), si bien, la mayoría de los autores utiliza semen con una motilidad comprendida entre un 70-80% (Thomas y cols., 1993; Ivanova-Kicheva y cols., 1997; Yildiz y cols., 2000) y unos pocos autores utilizan muestras seminales con motilidades superiores al 90% (Silva y Verstegen, 1995; Peña y Linde-Forsberg, 2000a, b).

En cuanto a la vitalidad espermática, en el presente trabajo los porcentajes medios observados oscilaron entre un 85 y un 94%. Este parámetro no mostró grandes diferencias entre individuos, siendo nuestros resultados comparables a los obtenidos en fresco por otros autores que describen valores de vitalidad que oscilan entre 80-95% (Silva y Verstegen, 1995; Silva y cols., 1996; Ivanova-Kicheva y cols., 1997; Albarracín y cols., 2004). En nuestro estudio, consideramos que las diferencias en los porcentajes de vitalidad fueron debidas probablemente

a la utilización de animales de diferentes razas, con edades no similares, además de la propia variabilidad individual que se puede presentar entre distintos ejemplares.

El parámetro microscópico que mayor oscilación mostró fue la concentración seminal (rango: 529.6-1156 x 10<sup>6</sup> esp/mL); estas variaciones se presentaron tanto entre diferentes individuos como dentro del mismo macho. Al igual que la vitalidad espermática, las diferencias entre individuos pudieron deberse a que los machos pertenecían a diferentes razas y presentaban distintas edades. Asimismo, varios autores defienden la teoría de que la producción espermática depende de la cantidad de parénquima testicular presente; de hecho, se ha establecido que los ejemplares de razas grandes producen mayor cantidad de espermatozoides que los de razas pequeñas que tienen menor tamaño testicular (Johnston y cols., 2001; Batista y cols., 2006) y queda perfectamente claro que las reservas espermáticas del epidídimo dependen del tamaño del animal (England, 1999). Con respecto a la variación dentro de un mismo individuo, las concentraciones espermáticas fueron mayores a partir de la 2ª recogida, conforme la excreción espermática adquiría cierta regularidad.

Finalmente, aunque se observó una cierta variabilidad en algunos individuos concretos, el porcentaje medio de morfoanomalías y acrosomías presentaba siempre valores bajos (por debajo del 18% y del 10%, respectivamente). Esta circunstancia podía asociarse a que los ejemplares empleados se encontraban en una condición corporal, estado sanitario y rango de edad óptimos para los procesos de generación de espermatozoides normales. De hecho, hay estudios que demuestran que un mayor porcentaje de morfoanomalías puede aparecer como consecuencia de inflamaciones localizadas a nivel genital, hipertermia, infecciones del tracto reproductivo, disminución de la secreción de LH y testosterona, alteraciones iatrogénicas, edad avanzada, etc... (Oettlé y Soley, 1986; Paramo y cols., 1993; Kawakami y cols., 1998; Peña, 2004).

## 5.1.2. Características seminales post-descongelación

### 5.1.2.1. Motilidad espermática post-descongelación

En el protocolo de congelación con nitrógeno líquido, como norma general, los resultados de motilidad más elevados se obtuvieron cuando se utilizaba un diluyente con un 6% de glicerol final. En la casi totalidad de los machos, la motilidad espermática no sufrió modificaciones en los primeros tres meses tras la congelación; no obstante, en la mitad de los machos se presentaron descensos significativos en la motilidad el día 365, independientemente de la concentración final de glicerol. Los resultados obtenidos en nuestro estudio fueron comparables a los publicados por otros autores que utilizan un diluyente con un 5% de glicerol final (Peña y Linde-Forsberg, 2000a, b), con valores que oscilan entre un 20 y un 59% de motilidad individual progresiva tras varias semanas de criopreservación. Algunos autores obtienen resultados elevados (motilidad post-descongelación > 60%), cuando se utiliza un 8% de glicerol en el proceso de diluyoconservación seminal (Silva y Versteegen, 1995; Silva y cols., 1996). Un estudio desarrollado a partir de semen procedente del epidídimo (Hewitt y cols., 2001) obtiene unos resultados de  $6.2 \pm 7.5$  % de motilidad a los 7 días post-congelación, utilizando un diluyente con una concentración final de glicerol del 6%. En un estudio previo desarrollado en nuestro laboratorio, tras 4 meses de conservación en nitrógeno líquido, los resultados mostraron unos valores medios ( $\pm$  SEM) del  $69.5 \pm 0.9$  y  $73.7 \pm 0.5$  % utilizando un diluyente con un 5% de glicerol final (Alamo, 2003; Alamo y cols., 2005); asimismo, en un trabajo realizado en perros de la raza Dogo Canario se observó como el rango de motilidad variaba entre 60-70% (Batista y cols., 2006).

En nuestro estudio pudimos comprobar que al añadir un 6% de glicerol al diluyente, se mejoraba su poder crioprotector y esta circunstancia provocaba un ligero aumento en el porcentaje de motilidad post-descongelación. Otros autores, que han realizado estudios utilizando diferentes concentraciones de glicerol han obtenido resultados diversos, así Olar y cols. (1989) demostraron que la motilidad post-descongelación de los espermatozoides era mejor con un 2-4% de glicerol que cuando se utilizaba un 8%, mientras que Fontbonne (1990) no encontró diferencias entre utilizar diluyentes con un 4 o un 8% de glicerol. Finalmente, Fontbonne y Badinand (1993) observaron que no se presentaban diferencias cuando se utilizaba un 3.2 o un 6.4% de glicerol en la concentración final, mientras que cuando se utilizaba un 1.6% se provocaba un descenso significativo de la motilidad post-descongelación.

Otros autores, utilizando otros envases de conservación y con un 6% de glicerol de concentración final en el diluyente, obtienen resultados de motilidad individual progresiva del

29.1 ± 1.3 y 34.1 ± 2.4% en pellets y tubos de aluminio de 5 mL respectivamente (Ivanova-Kicheva y cols., 1997). Cuando la concentración final de glicerol se incrementa al 8% (Ivanova-Kicheva y cols., 1997), se detectaban valores medios de motilidad del 20.5 ± 1.3 y 25.9 ± 2.4% para pellets y tubos de aluminio de 5 mL, respectivamente.

En cuanto al método de congelación mediante la utilización de ultracongeladores, los mejores resultados se obtuvieron cuando el diluyente empleado contenía un 6% de glicerol. En general, los valores se mantenían bastante estables a lo largo de todo el periodo experimental (rango medio: 50-70%). En un estudio previo (Alamo, 2003; Alamo y cols., 2005), se observaba que empleando un diluyente con un 5% de glicerol final, la motilidad espermática post-descongelación se mantenía prácticamente constante a lo largo de los 4 meses que duró el periodo experimental (rango medio: 68.2-70.6%). Los resultados obtenidos en perros de la raza Dogo Canario tras 4 meses de conservación mediante ultracongelador de -152 °C, oscilaban entre 57-75% (Batista y cols., 2006), siendo estos resultados comparables a los obtenidos en nuestro estudio.

En general, los resultados de motilidad individual progresiva obtenidos con ultracongeladores de -152 °C eran ligeramente superiores a los de nitrógeno líquido en 5 de los 8 perros estudiados, si bien no se observaron diferencias significativas entre los dos procedimientos valorados. Sólo en un ejemplar se obtenían mejores resultados con nitrógeno líquido cuando se utilizaba el diluyente con un 5% de glicerol, mientras que cuando se utilizaba mayor concentración de glicerol, el método que mejor resultado aportaba era el ultracongelador de -152 °C. A la vista de los resultados, no observamos diferencias significativas entre los métodos y no se puede concluir que un protocolo de congelación genere mejores resultados que el otro. En una serie de estudios previos, pudimos comprobar que la motilidad individual no mostraba diferencias significativas entre las muestras seminales congeladas con nitrógeno líquido o las conservadas mediante la utilización de ultracongeladores de -152° C, tanto a corto plazo (Alamo, 2003; Alamo y cols., 2005), como a medio plazo (Batista y cols., 2006).

Tanto en el presente estudio, como en los realizados con anterioridad en nuestro laboratorio (Alamo y cols., 2005; Batista y cols., 2006), se observa que la motilidad post-descongelación comenzaba a manifestar un ligero descenso en aquellas valoraciones realizadas a partir de los 4-6 meses de almacenamiento. En la especie caprina, se han realizado diferentes estudios que han confirmado que al aumentar el tiempo de conservación en nitrógeno líquido, se

producía una reducción significativa de la motilidad espermática y se incrementaba el porcentaje de morfoanomalías, disminuyendo por tanto la viabilidad del semen, y en consecuencia su capacidad de fertilización (Leboeuf y cols., 2000). No obstante, tanto en la especie caprina como en la bovina, se han obtenido descendencia tras realizar inseminaciones con semen congelado durante muchos años, si bien no queda absolutamente claro el número de dosis seminales empleadas para conseguir ese resultado.

En la especie canina, se han obtenido gestaciones tras inseminar a hembras con semen congelado (Linde-Forsberg y Forsberg, 1989; Fontbonne y Badinand, 1993; Nöthling y Volkmann, 1993; Silva y cols., 1996), si bien existe mucha variabilidad en cuanto al número de dosis empleadas, la ruta de administración y la frecuencia de las mismas. Asimismo, la mayoría de estos estudios no indican el tiempo de conservación del semen antes de su utilización. Sin embargo, en la especie canina, no se han realizado estudios consistentes que valoren la influencia del tiempo de conservación sobre la calidad seminal *in vitro* o sobre la fertilidad.

Peña y cols. (2003) realizando un estudio sobre los beneficios del Equex sobre la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular proponen, como posible explicación a la mejoría observada en la calidad seminal post-congelación, que aquellas membranas que no se encuentran protegidas por la adición de Equex en el diluyente, se despolarizan y la célula muere probablemente porque la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  no es capaz de controlar el paso de calcio extracelular al interior de la célula, disminuyendo la concentración del mismo. Asimismo, esta autora defiende que debe existir una pequeña subpoblación de espermatozoides cuya membrana es especialmente resistente a la criopreservación, sobreviviendo a todos los procedimientos de manipulación y congelación seminal con bajas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Del mismo modo, otros autores han comprobado, tras realizar un análisis discriminativo de los diferentes tipos de velocidad presentes en el eyaculado canino post-congelación, que existen distintas subpoblaciones de espermatozoides con diferentes velocidades concluyendo que los procedimientos de congelación-descongelación no sólo afectan a la motilidad espermática, sino que provocan cambios estructurales en la membrana de los espermatozoides caninos (Núñez-Martínez y cols., 2005). Por otro lado, se han realizado estudios en la especie caprina (Leboeuf y cols., 2000) que defienden la teoría de que el descenso en los valores de la motilidad conforme aumenta el tiempo de almacenaje podría deberse a que, si bien la criopreservación seminal ralentiza el metabolismo celular, no lo detiene completamente, razón por la cual este gasto lento pero continuo de energía termina por provocar la muerte celular y, por tanto, un detrimento en la

calidad seminal post-congelación. En nuestro trabajo, a la vista de los resultados, podrían tener cabida ambas propuestas: por una parte, parece lógico pensar que el envejecimiento de los espermatozoides durante la conservación (tanto en nitrógeno líquido como en ultracongelador) pueda ocurrir en el semen canino de manera similar a lo observado en la especie caprina; asimismo, es factible especular que la mejor motilidad espermática tras la descongelación que presentaron determinados ejemplares, podría ser consecuencia de que poseían mayor proporción de estos espermatozoides especialmente resistentes a los procesos de diluyococonservación y congelación seminal que proponen Peña y cols.(2003).

Con respecto a la evolución de la motilidad espermática desde el momento de la descongelación hasta 6 horas tras la misma, se pudo observar que la dinámica de motilidad espermática fue muy parecida en todos los ejemplares. De manera general, durante los primeros 6 meses de crioconservación, en las muestras descongeladas se observaba una progresiva disminución de la motilidad espermática en las primeras dos horas de incubación, y sólo en ejemplares concretos (perros 2 y 6) y en algunos protocolos (5% glicerol) este descenso de la motilidad espermática era muy brusco; entre las 2 y 4 horas de incubación, la mayoría de las muestras presentaron una caída manifiesta, siendo lo habitual que 6 horas tras la descongelación, la casi totalidad de las muestras mostrasen valores prácticamente inapreciables de motilidad. En aquellas muestras valoradas tras 1 año de conservación, sí se observaron comportamientos diferentes en función del individuo, puesto que en algunos machos (3, 5 y 8) se partían de niveles superiores al 50% inmediatamente tras la descongelación, mientras que en otros ejemplares (perros 1, 2 y 4) la motilidad era inferior al 35% ya desde el primer momento tras la descongelación.

Peña y Linde-Fosberg (2000a), tras descongelar dosis seminales diluidas de manera similar a la nuestra (5% glicerol, 0.5% Equex,  $50 \times 10^6$  espermatozoides/pajuela) no encuentran diferencias significativas en la progresión de la motilidad espermática durante las primeras dos horas de incubación; no obstante, 4 horas tras la descongelación sí se observa una notable disminución de la motilidad progresiva, hasta alcanzar valores prácticamente inapreciables entre las 6 y 8 horas de incubación. Una dinámica similar se obtuvo en otro estudio (Rota y cols., 1999b), donde tras descongelar diferentes dosis seminales, se detectaba una disminución de la motilidad individual progresiva conforme avanzaba el periodo de incubación. No obstante, en otras experiencias (Peña y Linde-Forsberg, 2000a, b), se detectó que si las pajuelas eran diluidas en TRIS inmediatamente tras la descongelación, la motilidad espermática se mantenía

elevada durante más tiempo de incubación, de tal forma que se mantenían en valores superiores al 40% durante las primeras 4 horas de incubación, para descender alrededor de un 20% a las 8 horas tras la descongelación.

Actualmente, la mayoría de los trabajos publicados (Rijsselaere y cols., 2003; Peña, 2004; Rijsselaere y cols., 2005b) utilizan una tecnología más sofisticada para la determinación de la motilidad espermática (sistema CASA) que la empleada en nuestro estudio. Si bien estos procedimientos automatizados hacen más objetiva la precisión de la medida, hay autores como Verstegen y cols. (2002) que defienden que la utilización de este tipo de sistemas presenta una serie de factores técnicos y biológicos que pueden alterar su fiabilidad; entre otros, la temperatura del semen, el volumen analizado, el tipo de cámara utilizada, el tiempo transcurrido entre la recogida y el análisis, la concentración de semen, el diluyente empleado, el tipo de objetivo usado, la iluminación del microscopio, el área de células analizada, etc... En el presente estudio, las valoraciones de la motilidad espermática se realizaban siempre por los mismos dos técnicos, que en todo momento desconocían a qué individuo correspondía cada muestra y los valores otorgados por el otro técnico. Asimismo, el número de campos valorados era un mínimo de 10, siempre en la zona central de la muestra. Con estas medidas se pretendía obtener valores de la manera más objetiva posible y que no hubiesen influencias externas que alterasen el criterio de cada técnico a la hora de realizar su valoración.

Por otro lado, en nuestro laboratorio hemos desarrollado recientemente diferentes experiencias, donde se comparaba la motilidad espermática de una muestra de semen descongelada (tras crioconservación en nitrógeno líquido o en ultracongelador de  $-152\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), tanto por valoración subjetiva (de manera similar a la realizada en la presente tesis), como por la utilización de un sistema automatizado de análisis espermático (CASA). Tras realizar determinaciones sobre muestras crioconservadas de la mayor parte de los machos utilizados en esta experiencia, hemos podido constatar, que los valores de motilidad individual progresiva (velocidad lineal) definidos por el sistema CASA eran (como media) un 10% inferiores a los valores establecidos mediante valoración subjetiva. No obstante, los resultados también han demostrado que existía un alto grado de correlación ( $r=0,89$ ;  $p<0.005$ ) entre los valores definidos por ambos protocolos, independientemente de los individuos empleados. Este hallazgo, compatible con los obtenidos por otros autores que han realizado la valoración de la calidad seminal tanto por criterios subjetivos como objetivos (Peña y cols., 2003), nos permite suponer que aunque los valores de motilidad individual progresiva obtenidos en nuestro trabajo de



investigación puedan ser ligeramente superiores a los definidos por el sistema CASA, son igualmente válidos para contrastar el grado de motilidad de una muestra seminal.

#### 5.1.2.2. Motilidad espermática post-descongelación: variabilidad individual

En fresco, no se detectaban diferencias significativas en la motilidad individual progresiva entre los diferentes ejemplares (85.0-92.5%). No obstante, tras la descongelación, a partir de los resultados obtenidos, podría suponerse que existiese un cierto grado de variabilidad individual en la congelabilidad del semen. Dentro de cada ejemplar, la motilidad individual mostraba valores prácticamente uniformes a lo largo de todo el periodo experimental en 5 de los 8 machos valorados (1, 3, 5, 6 y 8). En los otros 3 individuos (2, 4 y 7), se presentaron valores de motilidad individual progresiva relativamente homogéneos hasta los 3 meses tras la congelación; sin embargo, tras 6-12 meses de crioconservación, las evaluaciones mostraron valores muy dispersos, independientemente del protocolo de congelación o la cantidad final de glicerol en las dosis seminales.

A la vista de estos resultados, es posible deducir que existe una predisposición individual a la congelación seminal; este hecho es más evidente a partir de 6-12 meses de conservación de las muestras, particularmente cuando se empleaba menor concentración de glicerol. No es posible realizar una comparación muy exhaustiva con otros autores, porque en la mayoría de los trabajos publicados se trabaja con un *pool* seminal; sólo algunos autores como Batista y cols. (2006) describen resultados tras congelar-descongelar semen de individuos concretos; en este estudio, se observaba que partiendo de calidades seminales similares antes de la congelación, algunos de los machos empleados presentan descensos en la motilidad post-descongelación más evidentes que otros, proponiendo la existencia de una predisposición individual a la congelación. Nöthling y Shuttleworth (2005) muestran resultados similares a los obtenidos en nuestro estudio: partiendo de ejemplares de diferentes razas y con una similar motilidad individual en fresco, tras la congelación en nitrógeno líquido, se observa que existían diferencias significativas en la calidad seminal post-congelación entre los diferentes ejemplares; no obstante, en este estudio no queda absolutamente claro el tiempo de conservación a que fueron sometidas las pajuelas.

Por otro lado, al trabajar con individuos y no con un *pool*, los resultados individuales presentan valores más concretos que cuando se trabaja con un *pool*, donde las estimaciones más extremas de los individuos utilizados se compensan, mostrando el análisis de la muestra

valores intermedios. Rota y cols. (1999a) proponen que la inclusión en un *pool* de semen de uno o más eyaculados de baja calidad, podría disminuir la capacidad fertilizante de la mezcla resultante. En nuestro estudio, todos los perros mostraban una excelente calidad seminal en fresco, pero cabe suponer que si se hubiese realizado una mezcla de los eyaculados, los ejemplares que presentaran una peor congelabilidad del semen, hubiesen provocado una disminución de la motilidad del conjunto de eyaculados. No obstante, Silva y cols. (1996) no encuentran diferencias en la tasa de fertilidad tras inseminar con semen descongelado, procedente de un *pool* de 7 machos, o bien tras inseminar con semen descongelado procedente de 3 machos, si bien el número de hembras inseminadas no fue excesivamente elevado.

### 5.1.2.3. Vitalidad espermática post-descongelación

Con respecto a la vitalidad, cuando se empleó el nitrógeno líquido como método de congelación los resultados no evidenciaban diferencias significativas entre las muestras congeladas utilizando un 5-6% de glicerol, aunque en la mitad de los ejemplares se obtuvieron valores de vitalidad ligeramente superiores en aquellas muestras que se congelaron con un 6% de glicerol final. Nuestros resultados fueron similares a los obtenidos en un estudio previo desarrollado en nuestro laboratorio, si bien el tiempo de valoración fue de 4 meses y el diluyente empleado contenía un 5% de glicerol final (Alamo, 2003; Alamo y cols., 2005). Nuestros hallazgos son comparables a otros estudios que utilizan similares medios de diluyoconservación, presentando valores de vitalidad espermática que oscilan entre un 55-65% de espermatozoides vivos (Hay y cols., 1997a; Peña y Linde-Forsberg, 2000a, b; Peña y cols., 2003). Otros autores también describen valores de vitalidad comprendidos entre 70-85%, pero el diluyente empleado en estos estudios contenía un 8% de glicerol final (Silva y cols., 1996; Yildiz y cols., 2000).

En general, cuando se utilizaba la técnica de congelación con ultracongeladores de -152 °C, se observó que los porcentajes de vitalidad eran superiores en aquellas muestras con un 6% de glicerol final. Estos resultados son comparables a los obtenidos en otros trabajos con un similar protocolo de crioconservación donde se valoró el porcentaje de vitalidad a lo largo de 4 meses (utilizando solamente un diluyente con un 5% de glicerol) oscilando los valores observados entre un 80 y un 90% (Alamo, 2003; Alamo y cols., 2005). Sin embargo, otros estudios desarrollados en la raza Dogo Canario, obtienen unos porcentajes de espermatozoides vivos presentes en las muestras valoradas que oscilaban entre un 69-89% (Batista y cols., 2006).

Si se comparan ambos protocolos de congelación (nitrógeno líquido *vs* ultracongelador de  $-152\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), no se define con claridad si una técnica de congelación es mejor que la otra. De hecho, los resultados de vitalidad espermática fueron bastante homogéneos entre técnicas, e incluso entre ejemplares. Es posible concluir que los resultados de vitalidad son muy satisfactorios cuando se utilizan ultracongeladores para la crioconservación del semen canino.

Al observar los resultados de vitalidad en cada individuo, se detectaba que en 5 de los 8 animales valorados (1, 3, 5, 6 y 8), existía una buena correlación entre los valores mostrados en la motilidad y la vitalidad espermática a lo largo de todo el periodo experimental y para todos los procedimientos valorados. Sin embargo, en los otros 3 animales valorados, los resultados de ambos parámetros espermáticos presentaron variaciones evidentes entre el comportamiento de la motilidad y la vitalidad post-congelación: el perro 2 mostraba descensos significativos en la motilidad el día 365 en todos los protocolos estudiados, pero en cambio la vitalidad sólo sufrió este descenso cuando el diluyente empleado presentaba menor concentración de glicerol; por otro lado, el perro 4 mostraba un descenso muy evidente en el porcentaje de motilidad el día 365 post-congelación, sin embargo, la vitalidad sólo presentaba el descenso en su valor el día 365 cuando se utilizaba el ultracongelador de  $-152\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Finalmente, el perro 7 presentaba un descenso significativo en la motilidad y en la vitalidad el día 365 cuando se utilizaba el ultracongelador de  $-152\text{ }^{\circ}\text{C}$  y un 5% de glicerol.

Por último, en base a los resultados observados, parece lógico suponer que pueda existir cierta predisposición individual a la congelación, ya que hay individuos que aunque mantienen valores medios de vitalidad del 73% (perros 2 y 4), la motilidad sufre un notable descenso (15% y 30%, respectivamente). Este hecho fue ya constatado por Batista y cols. (2006) en un estudio realizado en perros de la raza Dogo Canario, donde observaron que de los 5 animales empleados en su estudio, dos de ellos manifestaron un detrimento significativo en la motilidad seminal a partir de 4 meses de crioconservación, pero los valores de vitalidad espermática permanecían relativamente altos. Asimismo, Peña y cols. (2003) proponían la posibilidad de que el deterioro de la calidad seminal se debiese a una disminución en la concentración de calcio intracelular, por un mal funcionamiento de la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  presente en la membrana celular del espermatozoide, debido a la agresión que suponía los procedimientos de criopreservación; esta modificación en el funcionamiento de la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  podría tener reflejo primero sobre la motilidad espermática, para posteriormente terminar afectando a la vitalidad espermática.

#### 5.1.2.4. Porcentaje de acrosomías post-descongelación

Utilizando el protocolo de congelación con nitrógeno líquido, no existen grandes diferencias entre las pajuelas que se congelaron mediante el uso de un diluyente con un 5 % o un 6% de glicerol, si bien, se detectaron valores ligeramente superiores de acrosomías cuando se empleaba un diluyente con una mayor concentración de glicerol. Estos valores son comparables con los obtenidos en otros estudios donde se describen rangos de acrosomías hasta de un 23% post-descongelación (Hay y cols., 1997a). En otros estudios realizados en nuestro laboratorio utilizando un 5% de glicerol en el diluyente, los valores individuales oscilaron entre un 3-12% (Alamo, 2003; Alamo y cols., 2005).

Con respecto a la utilización de ultracongeladores de -152 °C, en nuestro estudio obtuvimos unos valores medios que se situaron entre 3.5 y un 16%. Al igual que ocurría con el nitrógeno líquido, se observó que cuando existía una mayor concentración de glicerol en el diluyente empleado, el porcentaje de acrosomías era ligeramente superior. Nuestros resultados fueron similares a los obtenidos en estudios previos (Alamo, 2003; Alamo y cols., 2005) donde se valoró el semen durante 4 meses utilizando un 5% de glicerol (rango medio: 5-9%).

Si se comparan ambas técnicas entre sí, no se detectan diferencias significativas entre utilizar el protocolo de congelación con nitrógeno líquido o emplear el ultracongelador de -152 °C, si bien, hay un ligero aumento (no significativo) del porcentaje de acrosomías en las muestras congeladas con nitrógeno líquido.

Un hallazgo común en ambos protocolos de congelación, es que el porcentaje de acrosomías era ligeramente superior cuando se empleaba una mayor concentración de glicerol para crioconservar las muestras. Diferentes autores postulan que el glicerol, además de los efectos osmóticos beneficiosos para la congelación seminal, actúa directamente sobre la membrana espermática y, aunque no se conoce con exactitud la naturaleza de esta acción, puede relacionarse con la alteración directa de las capas de membrana (Hempling y White, 1984; Anchoroguy y cols., 1987; Crowe y cols., 1987; Goodrich y cols., 1988), la interacción con los enlaces de proteínas y glicoproteínas (Armitage, 1986), o bien la inducción de un incremento de la demanda bioenergética (Hammerstedt y cols., 1990). Peña (1997) propone que la interacción de todos estos factores, podría explicar porqué la adición de concentraciones elevadas de glicerol provocan mejores resultados de motilidad, pero ello va en detrimento del porcentaje de anomalías en los espermatozoides presentes en las muestras descongeladas.

Al estudiar cada ejemplar por separado, se observaba que en 4 de los perros (3, 5, 6 y 8), los valores de acrosomías siempre fueron inferiores al 10%, independientemente de la técnica utilizada, la concentración final de glicerol y el tiempo de crioconservación. En los 4 machos restantes (1, 2, 4 y 7) se detectaron porcentajes de acrosomías superiores al 10%, fundamentalmente el día 365 de crioconservación y con un 6% de glicerol final; los resultados parecen mostrar que también en este parámetro, aunque con menos intensidad, existe un cierto grado de variabilidad individual post-descongelación. Los ejemplares que tenían valores de motilidad espermática más homogéneos (perros 3, 5 y 8) a lo largo de todo el periodo experimental y para todas las técnicas, mostraban este mismo comportamiento cuando se valoraban las acrosomías presentes en las muestras. Asimismo, los perros 1 y 6 también evidenciaban un comportamiento correlacionado entre ambos parámetros, ya que las variaciones que se manifestaron en los dos parámetros ocurrieron exactamente los mismo días y para las mismas técnicas en ambos ejemplares. El resto de los individuos presentaron comportamientos más arbitrarios en lo que a la correlación entre parámetros se refiere.

#### 5.1.2.5. Porcentaje de morfoanomalías post-descongelación

En la técnica de congelación con nitrógeno líquido, los valores medios de nuestro estudio oscilaron entre 5.5-22.7%. No se detectaron diferencias evidentes entre los resultados obtenidos cuando se utilizaba un 5% o un 6% de glicerol, aunque se observó un porcentaje ligeramente superior de morfoanomalías en las muestras congeladas con mayor concentración de glicerol (salvo en los perros 1 y 2). Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores: se describen desde valores inferiores al 15% de morfoanomalías (Iguer-ouada y Verstegen, 2001), hasta un 20% de espermatozoides anormales presentes en las muestras congeladas-descongeladas (Silva y cols., 1996), e incluso niveles superiores al 50% (Hay y cols., 1997a).

En un estudio realizado previamente en nuestro laboratorio, utilizando un diluyente que presentaba un 5% de glicerol y tras 4 meses de conservación en nitrógeno líquido, se mostraron unos valores de morfoanomalías ligeramente superiores al 10% (Alamo, 2003; Alamo y cols., 2005). En un estudio realizado en perros de la raza Dogo Canario (Batista y cols., 2006), utilizando un diluyente con un 5% de glicerol, los resultados medios oscilaron entre 5-15% siendo estos valores ligeramente más bajos que los obtenidos en nuestro estudio.

Por otro lado, cuando se utilizaba la técnica de congelación mediante el uso de ultracongeladores de -152 °C, los resultados medios obtenidos oscilaban entre un 4 y un 22%.

En esta técnica, los porcentajes más elevados de morfoanomalías no mostraron un patrón claro de distribución, si bien los valores de espermatozoides anormales eran superiores cuando se empleaba una mayor concentración de glicerol en el diluyente. Estos resultados son comparables a los obtenidos en otro trabajo previo donde se utilizaba un 5% de glicerol y se valoraban las muestras después de 4 meses de conservación (Alamo, 2003; Alamo y cols., 2005), con un similar procedimiento de criopreservación. Batista y cols. (2006), en el estudio realizado en el Dogo Canario, con dosis crioconservadas con un 5% de glicerol, obtenían un porcentaje de morfoanoamalias ligeramente inferior al observado en nuestro estudio, si bien se detectaba un notable incremento entre los 4 y 6 meses de conservación.

Al igual que ocurre con las acrosomías, el porcentaje de morfoanomalías mostró valores similares entre las técnicas valoradas, aunque los valores obtenidos fueron ligeramente superiores cuando se utilizaba nitrógeno líquido que cuando se empleaba el ultracongelador de -152 °C. Asimismo, en ambas técnicas se observaba que cuando se adicionaba un porcentaje superior de glicerol en el diluyente empleado, los valores de morfoanomalías se incrementaban ligeramente. No obstante, las diferencias entre individuos y entre las técnicas valoradas no fueron mayoritariamente significativas.

Con respecto a la valoración entre individuos, las morfoanomalías fue el parámetro que mostraba un comportamiento más errático entre los distintos ejemplares. De esta forma, a partir del día 180 de crioconservación, en la totalidad de los machos se mostraban valores de morfoanomalías superiores al 10% en todos los procedimientos valorados, aunque hubieron algunas excepciones como los perros 1, 3, 4, 7 y 8 donde el porcentaje observado era menor. La distribución en los valores de los 6 primeros meses de estudio fue bastante heterogénea, siendo difícil establecer la causa exacta de esta dispersión de los resultados. En muy pocos trabajos se valora el porcentaje de morfoanomalías, pero se describe que el valor que debe presentar este parámetro debería ser inferior al 20-25% (Silva y cols., 1996; Alamo, 2003; Alamo y cols., 2005; Batista y cols., 2006), siendo compatibles con los obtenidos en el presente estudio.

A diferencia de lo que ocurre con los otros parámetros espermáticos, resulta complicado establecer correlaciones entre este parámetro y los demás. Sí queda absolutamente claro que los tres ejemplares (perros 3, 5 y 8) que mostraban la mejor calidad seminal post-congelación (mejores valores de motilidad individual progresiva, vitalidad y acrosomías) fueron los que, en

general, presentaron menor proporción de morfoanomalías para todas las técnicas empleadas y durante todo el periodo experimental.

En nuestro estudio, se presentaron porcentajes de morfoanomalías elevados que no se repartían homogéneamente a lo largo del periodo experimental. Peña (2004) describe que en ocasiones las morfoanomalías secundarias observadas en las muestras pueden ser consecuencia de fallos en la espermiogénesis o bien a errores de manipulación por parte del técnico. Batista y cols. (2006) observaron que no se presentaba un mayor número de espermatozoides con morfoanomalías secundarias cuando se utilizaba el ultracongelador de  $-152\text{ }^{\circ}\text{C}$  que cuando se empleaba el protocolo de nitrógeno líquido; este hecho parece indicar que el uso del ultracongelador de  $-152\text{ }^{\circ}\text{C}$  no produce un mayor número de anomalías en la morfología espermática. Por otro lado, en un trabajo previo (Alamo y cols., 2005), ya se define la rampa del descenso de temperatura determinada para el ultracongelador de  $-152\text{ }^{\circ}\text{C}$ , donde se comprobó que el descenso era de  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  desde  $5\text{ a }-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  y de  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  desde  $-10\text{ a }-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Este hallazgo coincide con diferentes estudios realizados con nitrógeno líquido, donde se concluye que la rampa óptima de descenso de temperatura para lograr unas óptimas condiciones de congelar semen canino es de  $12\text{-}30\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  (Watson, 1995; Hay y cols., 1997b; Peña y Linde-Forsberg, 2000a).

Hay estudios donde se han intentado utilizar sistemas informáticos para la determinación de morfoanomalías como el CASA, pero no han resultado muy exitosos porque observaron la existencia de una gran variabilidad individual en la morfología espermática de cada uno de los animales utilizados, resultando algo complejo establecer una clasificación objetiva de las morfoanomalías que podían encontrarse en esta especie (Núñez-Martínez y cols., 2005). No obstante, otros autores ya proponen este modelo automatizado para la determinación de las morfoanomalías espermáticas (Rijsselaere y cols., 2005b).

### 5.1.3. Valoración global de los protocolos de congelación, porcentaje de glicerol y la influencia individual post-descongelación

#### 5.1.3.1. Valoración global de los protocolos de congelación

Aunque el protocolo de nitrógeno líquido está estandarizado para la criopreservación seminal de la mayoría de las especies, consideramos que el uso de ultracongeladores de  $-152\text{ }^{\circ}\text{C}$  puede ser un método completamente válido para congelar y conservar el semen canino, como ya se demostró en estudios previos realizados tanto en la especie canina (Alamo, 2003; Alamo y cols., 2005; Batista y cols., 2006) como en la especie caprina (Medrano y cols., 2002).

El uso de este procedimiento de congelación presenta una serie de ventajas frente al nitrógeno líquido. Mediante la utilización del ultracongelador de  $-152\text{ }^{\circ}\text{C}$ , el método de congelación se simplifica enormemente, puesto que sólo es necesario disminuir la temperatura de la dilución seminal hasta  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , momento en el cual se introducen directamente las pajuelas en el ultracongelador. Otra ventaja, es que a diferencia del nitrógeno líquido, este tipo de aparato precisa exclusivamente de energía eléctrica y no es necesaria una reposición tan periódica como en los criocontenedores de nitrógeno líquido, que deben rellenarse cada cierto tiempo, originando unos costes fijos de carácter regular.

Otro aspecto a valorar es la capacidad de almacenaje de ambas técnicas. El ultracongelador de  $-152\text{ }^{\circ}\text{C}$  empleado en nuestro estudio presenta un volumen de almacenamiento (110 litros) mayor que los criocontenedores convencionales (50-60 litros); el número de pajuelas que se pueden conservar mediante el ultracongelador de  $-152\text{ }^{\circ}\text{C}$  es entre 5 y 10 veces superior al que se pueden conservar mediante un criocontenedor convencional. Finalmente, cabe destacar que la manipulación del nitrógeno líquido requiere tomar una serie de precauciones para evitar posibles accidentes; por el contrario, cuando se utiliza el ultracongelador de  $-152\text{ }^{\circ}\text{C}$ , la manipulación de las muestras es mucho más rápida y segura, no requiriendo tomar medidas de seguridad tan estrictas como cuando se utiliza nitrógeno líquido (Alamo, 2003).

Sin embargo, este protocolo también presenta una serie de desventajas que sería necesario valorar. El coste del ultracongelador de  $-152\text{ }^{\circ}\text{C}$  es elevado y su uso en las clínicas convencionales no es factible; por ello, aunque se muestra como un método completamente válido para la criopreservación seminal, solamente parece realizable en centros de investigación



o cuando se procesan una gran cantidad de muestras seminales. A este inconveniente, se puede sumar la circunstancia de que el tamaño del ultracongelador reduce marcadamente su movilidad. No obstante, no se puede obviar que en la especie canina, la mayor parte de las inseminaciones con semen congelado se hacen en centros de referencia, por lo que la hembra es la que se desplaza hasta donde se encuentra el especialista y las dosis de inseminación; esta circunstancia, permite rentabilizar el uso de un ultracongelador para la congelación y el almacenamiento del semen canino. El único inconveniente que podría presentarse a este respecto, sería en aquellas situaciones donde el semen deba transportarse a grandes distancias. Para valorar esta circunstancia, en nuestro laboratorio hemos realizado pruebas en una serie de muestras que tras congeladas y conservadas (hasta 4 meses) en el ultracongelador, fueron introducidas directamente al criocontenedor de nitrógeno líquido; posteriormente, se valoraba su calidad post-descongelación, a los 1 y 7 días después de encontrarse en nitrógeno líquido, y comprobamos que los parámetros de motilidad, vitalidad y morfoanomalías (resultados no mostrados) no sufrían efectos negativos tras esta manipulación. Con ello pretendíamos comprobar si se producía una disminución en la calidad seminal que limitase el transporte de la muestra, a la hora de precisar su utilización en otras localizaciones alejadas de nuestro laboratorio.

Por último, cabe destacar que ambos protocolos de congelación presentan rampas de congelación similares, por lo que el uso del ultracongelador de  $-152\text{ }^{\circ}\text{C}$  se presenta como un método totalmente válido para la criopreservación seminal, que además no debería provocar disminuciones evidentes en la calidad seminal.

#### 5.1.3.2. Valoración global del porcentaje de glicerol presente en el diluyente empleado

Conforme se iba desarrollando este estudio, pudimos comprobar que si bien, con el diluyente que presentaba una mayor concentración de glicerol se obtenían, en general, valores de motilidad más elevados que cuando se empleaba un 5% de glicerol, en el resto de los parámetros valorados no se observaron diferencias significativas entre emplear una mayor o menor concentración de glicerol. De hecho, la vitalidad no se mostraba excesivamente afectada por el porcentaje de glicerol presente en el diluyente, mientras que las morfoanomalías y las acrosomías mostraron valores ligeramente superiores cuando se empleaba una mayor concentración de glicerol.

Si consideramos el tiempo de almacenamiento al que estuvieron sometidas las muestras, observamos que los resultados de motilidad y vitalidad empeoraban ligeramente después de unos 3 meses de almacenamiento cuando se empleaba una menor concentración de glicerol; sin embargo, con respecto a las morfoanomalías y acrosomías no se muestra un patrón de distribución tan evidente ni entre diluyentes ni con respecto al tiempo. Este hecho fue constatado por Batista y cols. (2006), ya que observó que determinados animales mostraban descensos en la motilidad y la vitalidad después de 4 meses post-congelación.

A la vista de los resultados obtenidos, no se puede concluir que un diluyente sea mejor que el otro para la crioconservación del semen canino. Diversos autores han realizado estudios que se corresponden con nuestros resultados, ya que tampoco encontraron diferencias significativas entre utilizar una mayor o menor concentración de glicerol, comprobándose que los resultados empeoraban cuando se empleaban concentraciones de glicerol inferiores al 3% o superiores al 8% (Olar y cols., 1989; Fontbonne, 1990; Fontbonne y Badinand, 1993).

#### 5.1.3.3. Valoración global de las diferencias entre los diferentes individuos

Al igual que ocurre en otras especies, en principio, todos los perros reproductores son potenciales candidatos para someterse a los procedimientos de criopreservación seminal. Sin embargo, en nuestro trabajo quedaron patentes diferencias evidentes entre unos ejemplares y otros. Dos trabajos recientes, uno realizado en perros de la raza Dogo Canario (Batista y cols., 2006) y otro con animales de diferentes razas (Nöthling y Shuttleworth, 2005), confirmaron que partiendo de animales con calidades seminales similares en fresco, tras la congelación, había unos machos que mostraban mejores resultados post-descongelación que otros. En nuestro trabajo, también evidenciamos que de los 8 animales empleados en el estudio, 3 de ellos mostraban mejor predisposición para someterse a los procedimientos de diluyo-conservación y congelación seminal, manteniendo un rango de valores elevados y prácticamente constantes a lo largo del tiempo, mientras que el resto de los animales mostraban un empeoramiento de la calidad seminal conforme avanzaba el tiempo de conservación de la muestra, independientemente del método de congelación empleado.

Al igual que ocurre en otras especies (rumiantes, Singh y cols., 1996; porcino, Holt y cols., 2005), es posible pensar que existan ejemplares cuya calidad seminal presente una mejor predisposición para someterse a los protocolos de criopreservación. En la especie canina, la mayoría de los estudios publicados hacen referencia a la mejora del método de congelación,

pero sin tener en cuenta al individuo, ya que se suele trabajar con un *pool*/seminal procedente de diferentes machos. Por esta razón, parece necesario realizar más trabajos de criopreservación individual en la especie canina, que permitan definir si en esta especie, existe una predisposición individual en la congelabilidad del semen.

## 5.2. INDUCCIÓN DEL CELO, DETERMINACIÓN DEL MOMENTO ÓPTIMO DE INSEMINACIÓN Y TASA DE FERTILIDAD POST-INSEMINACIÓN

### 5.2.1. Tratamiento de inducción con cabergolina

Para la realización de las pruebas *in vivo*, a las hembras utilizadas en nuestra experiencia se les administró un tratamiento de inducción del estro a base de cabergolina. Al igual que otros autores (Verstegen y cols., 1999; Rota y cols., 2003) utilizamos este fármaco porque presenta muy buenos resultados y escasos efectos secundarios. En nuestro estudio, utilizamos una dosis de 5 µg/kg/día para inducir el estro que es la recomendada por el fabricante y la descrita en la mayoría de los trabajos publicados (Jeukenne y Verstegen, 1997; Verstegen y cols., 1999; Rota y cols., 2003; Kutzler, 2005b), no observando ningún efecto secundario independientemente de la duración del tratamiento.

En nuestro estudio, la cabergolina mostró una eficacia del 100% como tratamiento de inducción del celo, ya que todas las hembras mostraron signos de proestro, y presentaron ovulaciones, como se confirmó posteriormente por la determinación de los niveles plasmáticos de progesterona. En algunos trabajos, mediante el uso de la cabergolina, se describe que el porcentaje de hembras que muestran signos de estro oscilaba entre 80-100% (Jeukenne y Verstegen, 1997; Verstegen y cols., 1999; Rota y cols., 2003; Kutzler, 2005b); un porcentaje similar se ha descrito en otros estudios que utilizan bromocriptina como tratamiento de inducción del celo en la especie canina (Haafte y cols., 1989; Concannon, 1993; Concannon y Verstegen, 1997; Zoldag y cols., 2001), si bien se acompaña de efectos secundarios indeseables. Diferentes estudios sugieren que la inhibición de la secreción de prolactina puede regular la duración del anoestro y la aparición de un proestro inducido (Okkens y cols., 1997; Kutzler, 2005b). Estos estudios describen que todas las hembras que responden al tratamiento muestran un descenso evidente en la concentración plasmática de prolactina, mientras que aquellas hembras que sometidas a un tratamiento a base de agonistas de la dopamina, no desarrollan signos de estro, no mostraron descensos en su concentración de prolactina. De hecho se ha observado que la efectividad de la cabergolina pueda deberse a que provoca un descenso de la concentración de prolactina plasmática durante un tiempo más prolongado que otros antiprolactínicos como la metergolina (Kooistra y cols., 1999). Por el contrario, Beijerink y cols. (2003) afirman que la aplicación de bajas dosis de bromocriptina provoca un acortamiento del periodo interestro sin disminuir la concentración plasmática de prolactina, por lo que parece evidente que los agonistas de la dopamina provocan algún otro efecto responsable de la inducción del estro.

En general, eran necesarios alrededor de 4 semanas de tratamiento de inducción hasta que se mostraban los primeros signos del proestro. No obstante, hubieron hembras que mostraron los signos de celo antes que otras, con un rango de tiempo que oscilaba entre 13 y 41 días. Estos resultados son coincidentes con otros trabajos que utilizan este fármaco como inductor del estro, describiéndose que la mayoría de las hembras precisan de 15-30 días de tratamiento para manifestar signos de celo (Jeukenne y Verstegen, 1997; Verstegen y cols., 1999; Rota y cols., 2003; Kutzler, 2005b). No obstante, otros autores concretan este rango, concluyendo que cuando la hembra se encuentra en anoestro temprano se necesitan unos 20 días de tratamiento, mientras que cuando el tratamiento comienza a administrarse al final del anoestro, se necesitan tan sólo 6 días de tratamiento para inducir el celo en estas hembras (Verstegen y cols., 1999). En un estudio realizado con bromocriptina, se observó que se provocaba un acortamiento del periodo interestro, pero que la eficacia del tratamiento para inducir el estro era dosis dependiente, a mayor dosis más rápidamente se presentaba el inicio de proestro (Beijerink y cols., 2003).

Con respecto a la duración de los celos inducidos, en nuestra experiencia, observamos que los estros inducidos tenían una duración ligeramente más corta (proestro: 6.7 días; estro: 4.6 días) que los ocurridos de forma fisiológica. Otros trabajos que utilizan la cabergolina para inducir el celo (Verstegen y cols., 1999), no encuentran diferencias significativas entre la duración del celo inducido (14.5-16.0 días) frente a la duración de un celo fisiológico (17.4 días). En nuestro estudio, la menor duración del proestro-estro inducido podía deberse a diferentes factores: 8 de nuestras 10 hembras tenían alrededor de 14 meses cuando se les indujo el celo, mientras que en el trabajo descrito previamente la edad de las hembras oscilaba entre 3-8 años; por tanto, no podemos descartar un efecto de la edad sobre la duración del celo. Por otro lado, en nuestro tratamiento administramos la cabergolina hasta 2 días después de la aparición de los signos evidentes del proestro, mientras que en los estudios que utilizan cabergolina como inductor del proestro (Verstegen y cols., 1999; Rota y cols., 2003), la administración de cabergolina se prolonga entre 3 y 8 días tras la aparición del edema vulvar y la descarga serosanguinolenta; en nuestro caso, la menor duración en la administración de cabergolina podría tener como consecuencia una disminución del ciclo inducido.

### 5.2.2. Citología vaginal durante el tratamiento de inducción, proestro y estro inducidos

Para la realización de esta parte experimental, además de observar los cambios propios ocurridos en la mucosa vaginal, realizamos citologías vaginales seriadas (Olson y cols., 1984) para determinar cuando se manifestaba un patrón celular idóneo para realizar las inseminaciones.

Al igual que describe Rota y cols. (2003) el día de inicio del tratamiento se realizó un examen de la tonalidad de la mucosa y se tomó una muestra de citología vaginal. La totalidad de las hembras utilizadas presentaron una mucosa vaginal con aspecto sonrosado. Asimismo, el frotis que presentaban las perras era típico de anoestro donde predominaban las células parabasales y las intermedias pequeñas y, en algunas de las hembras, fue común observar la presencia de neutrófilos, mostrándose una ausencia total de células superficiales y de hematíes. Estos resultados coinciden con lo descrito por Concannon y DiGregorio (1986), donde resaltan que en un frotis vaginal de anoestro predominan las células parabasales y que es común observar algunos neutrófilos.

Conforme se continuaba con el tratamiento, los estratos celulares también fueron cambiando y al iniciarse el proestro (primer día de sangrado), el porcentaje de células parabasales había disminuido considerablemente llegando en la mayoría de las hembras a encontrarse ausentes. En este momento del ciclo, lo más representativo era el incremento de células intermedias grandes y superficiales. Además, la mucosa vaginal se tornaba de un rosado más intenso, unido a una descarga vaginal sanguinolenta evidente y edema vulvar. Estos hallazgos coinciden con los publicados por otros autores que consideran como primer día del proestro inducido aquel donde observaron descarga vaginal serosanguinolenta, edema vulvar manifiesto (Kutzler, 2005b), un frotis vaginal con presencia de eritrocitos y un número de células intermedias o superficiales  $\geq 30\%$  (Verstegen y cols., 1999). En aquellos trabajos donde se describe el patrón celular vaginal en celos no inducidos, el inicio del proestro muestra un detrimento en el porcentaje de células parabasales e intermedias pequeñas, aumentando la presencia de las intermedias grandes; asimismo, al final del proestro aparecen células superficiales ( $> 30\%$ ) y rara vez se observan neutrófilos (Olson y cols., 1984; Concannon y DiGregorio, 1986). Todos estos hallazgos coinciden con los observados en nuestra experiencia en los proestros inducidos a las hembras.

El día de la primera inseminación, la mayoría de las hembras presentaron una tonalidad pálida de la mucosa vaginal, aunque en algunos ejemplares la mucosa permaneció rosada e incluso se tornó hiperémica. En nuestro estudio, todas las hembras mostraron escasa descarga vaginal (e incluso ausencia) y presentaban más del 80% de células superficiales, mientras que las parabasales e intermedias pequeñas estaban totalmente ausentes. Kutzler (2005b) considera que para realizar la primera inseminación, deben presentarse un número de células cornificadas superior al 90%, mientras que Pinto y cols. (1999) consideran el primer día de estro y de inseminación cuando en el frotis vaginal se presentan un 100% de células cornificadas, realizando inseminaciones artificiales con semen fresco y refrigerado 3 veces por semana, hasta que el patrón celular mostraba un 50% de células no cornificadas. Otros autores, sin embargo, describen que el patrón celular presente en el estro va evolucionando, observándose conforme progresa esta fase del ciclo una mayor cornificación de las células presentes (Concannon y DiGregorio, 1986). En nuestro estudio, durante el periodo de inseminaciones, la citología vaginal presentó valores que oscilaron entre un 80 y un 98% y, en varios animales, el porcentaje de células superficiales nunca fue superior al 85% en ningún momento del proestro o estros inducidos.

En nuestro trabajo consideramos que el diestro comenzaba cuando el aspecto que presentaba la mucosa, volvía a recuperar una tonalidad rosada y se observaron las primeras células parabasales e intermedias. Además, en algunas hembras se presentaron células típicas de metaestro y células espumosas (Kustritz, 2005a) que confirmaban el momento del ciclo en que se encontraba la hembra. Algunos autores definen como primer día del diestro inducido cuando en los frotis vaginales se produce un descenso brusco de células superficiales en aproximadamente un 60%, reapareciendo las células intermedias y las parabasales (Verstegen y cols., 1999). Otros trabajos definen el primer día de diestro cuando en el frotis vaginal se presenta solamente un 20% de células cornificadas (Holst y Phemister, 1974). Finalmente, hay estudios que definen el principio del diestro el mismo día que comienzan a aparecer las primeras células no superficiales, y describen que este momento del ciclo está completamente establecido cuando reaparecen algunos neutrófilos (Concannon y DiGregorio, 1986). En nuestro estudio, 2 días después de finalizado el periodo de inseminaciones, el porcentaje medio de células superficiales era de 69%, mientras que entre 3 y 4 días tras esta fase del estro, el valor medio de células superficiales se situaba por debajo del 43%.

### 5.2.3. Niveles plasmáticos de progesterona desde el tratamiento de inducción hasta el periodo posterior a las inseminaciones

De manera similar a lo descrito en la mayoría de los trabajos publicados (Silva y Verstegen, 1995; Verstegen y cols., 1999; Watts y cols., 2001; Vannucchi y cols., 2002; Eilts y cols., 2005) también se tomaron muestras de sangre para la detección de la concentración de progesterona sérica y del pico preovulatorio de LH, si bien las determinaciones hormonales no se realizaron hasta después de finalizado el periodo de extracciones sanguíneas.

Al inicio del tratamiento, la progesterona plasmática en las muestras sanguíneas de las hembras utilizadas en nuestra experiencia, mostraba valores inferiores a 0.3 ng/mL. Asimismo, durante el tiempo que estuvimos administrando la cabergolina, se observaron niveles basales de progesterona, ya que la concentración plasmática presente fue siempre inferior a 0.6 ng/mL. Estos resultados son comparables a los descritos en algunos trabajos de inducción del estro mediante agonistas de la dopamina, donde se hace referencia a la concentración particularmente baja de progesterona que se observa desde el inicio del tratamiento hasta el comienzo del siguiente proestro (Rota y cols., 2003; Beijerink y cols., 2004). Asimismo, en estudios que emplean diferentes dosis de bromocriptina para inducir el celo se observa que la concentración plasmática de progesterona aumenta conforme mayor es la dosis de fármaco empleada (Beijerink y cols., 2003). En un ciclo fisiológico, se ha definido que los niveles plasmáticos de progesterona son basales (< 1 ng/mL) al final del anoestro (Jeffcoate, 2000); los resultados de estos autores son coherentes con los hallazgos observados en las muestras sanguíneas tomadas al inicio y durante el tratamiento con cabergolina de nuestro estudio.

Cuando se inició el sangrado (día 0) y hasta el día de la última inseminación, los valores de progesterona iban aumentando progresivamente, observándose el día de la primera inseminación valores superiores a 1.5 ng/mL en todas las hembras. Nuestros resultados son comparables a los descritos por Jeffcoate (2000) donde se afirma que, en ciclos fisiológicos, la concentración de progesterona que en anoestro era muy baja, aumentará hasta niveles detectables al final del proestro (alrededor de 1 ng/mL) para continuar aumentando durante el estro hasta niveles de 6-10 ng/mL. Asimismo, otros estudios describen que la concentración plasmática de progesterona durante el proestro fisiológico, va aumentando progresivamente hasta el pico de LH, situándose en valores cercanos a los 3 ng/mL (Silva y cols., 1996). En otras experiencias, donde se induce el celo con cabergolina, se observaba que los valores de progesterona obtenidos durante el inicio del proestro eran de aproximadamente 0.5 ng/mL



(Verstegen y cols., 1999; Rota y cols., 2003), coincidiendo estos resultados con los mostrados en nuestro estudio. Sin embargo, hay otros autores que describen que las concentraciones de progesterona encontradas justo antes de realizar las inseminaciones eran superiores a 5 ng/mL (Eilts y cols., 2005).

En nuestro estudio, en 9 de las 10 hembras, se mostraban valores iguales o superiores a 5 ng/mL en algún momento del periodo de inseminaciones. En general, se describe que la concentración de progesterona sérica el día de la ovulación debería ser de 5-8 ng/mL (Rota y cols., 1999a; Kustritz, 2005a); sin embargo, otros trabajos consideran que la concentración de progesterona plasmática que indica que ha ocurrido la ovulación es de 2-4 ng/mL (Jeffcoate, 2000) o bien, de 10 ng/mL (Klinc y cols., 2005). Asimismo, en otros estudios se definen que las concentraciones medias de progesterona sérica el día de la primera inseminación oscilaban entre 6.1 y 12.7 ng/mL (Silva y Verstegen, 1995; Silva y cols., 1996; Rota y cols., 1999a). Finalmente, otros autores consideran que desde el momento que se detecta por primera vez una concentración sérica de progesterona  $\geq 2$  ng/mL, esto se correspondería con el pico de LH (Rota y cols., 1999a; Jeffcoate, 2000; Eilts y cols., 2005). En virtud de lo anterior, podemos considerar que en nuestro estudio, la mayoría de las perras se inseminaron cuando las concentraciones de progesterona eran indicativas que la ovulación se había producido.

Cuando finalizó el periodo de inseminaciones, las concentraciones de progesterona sérica continuaron aumentando y en las muestras de sangre tomadas en el diestro, se mostraba una concentración plasmática de progesterona que oscilaba entre 5.6 y 50.2 ng/mL (valores medios: 16.9-38.0 ng/mL). Estos valores son comparables a los descritos para un celo fisiológico, ya que los primeros días del diestro la concentración de progesterona sérica que se describe es de 10-30 ng/mL (Jeffcoate, 2000). Asimismo, la concentración de progesterona seguirá aumentando progresivamente desde el inicio del diestro hasta 30 días después del pico de LH (Jeffcoate, 2000), para empezar a disminuir lentamente hasta el día 60; a partir de este momento, la progesterona experimentará una disminución más gradual (hasta que comienza otro anoestro), o bien, manifiesta una disminución más brusca, justo antes del final de la gestación. En otros estudios donde se ha empleado la cabergolina como inductor del celo, los valores observados son ligeramente inferiores a los obtenidos en nuestra experiencia, con valores medios que oscilan entre 18-23 ng/mL al inicio del diestro (Verstegen y cols., 1999; Watts y cols., 2001; Rota y cols., 2003). Finalmente, Verstegen y cols. (1999) comprobaron que en diestro no

existían diferencias entre los valores de progesterona observados en hembras con celo inducido o fisiológico (valores medios: 20 y 22 ng/mL respectivamente).

#### 5.2.4. Inseminación artificial

##### 5.2.4.1. Técnica de inseminación artificial

Durante esta fase del periodo experimental, utilizamos una técnica de inseminación intrauterina que combinaba la realización de una palpación transabdominal para localizar el cuello uterino, junto con la utilización de un catéter de inseminación de caprino modificado, recubierto con una vaina de polivinilo. Otros autores que llevan a cabo la inseminación artificial transcervical, realizan un procedimiento muy similar al empleado en nuestro estudio, pero describen el uso de vainas de nailon o bien el catéter de Farstad (Allen, 1992; Rota y cols., 1999a; Farstad, 2000a); por tanto, parece que la única diferencia fundamental entre nuestro método y el descrito por estos autores, es la vaina de inseminación. Asimismo, hay otros trabajos donde se describe el uso del catéter de Osiris; este método deposita el semen a nivel intracervical pero presenta la ventaja que posee un balón que se infla y evita el reflujo de semen hacia la vagina (Rota y cols., 1999a). En nuestro estudio, decidimos que era factible utilizar las vainas que se utilizaban en la especie caprina para el desarrollo de esta técnica de inseminación, por su fácil manipulación, su bajo coste y poca permeabilidad.

Algunos autores describen el uso de una técnica similar a la nuestra, pero que necesita un equipamiento técnico superior, ya que es necesario el uso de un uretero-renoscopio rígido conectado a una fuente de luz y a una videocámara, insuflando posteriormente CO<sub>2</sub> para visualizar el cuello del útero; a continuación, introducen una sonda urinaria uretral para perros a través del cervix hasta el interior del cuerpo del útero (Wilson, 1993). La ventaja principal que presenta esta técnica es que este método asegura que se visualiza y se atraviesa el cuello del útero. No obstante, en nuestro estudio no resultaba excesivamente complejo manipular simultáneamente el cuello del útero (por palpación transabdominal) y el catéter, hasta conseguir localizar la abertura que permitiera atravesar el cuello con el catéter hasta el cuerpo del útero.

Por otro lado, un gran número de estudios que realizan la deposición de semen en el interior del útero lo hacen vía laparoscópica (Silva y Verstegen, 1995; Silva y cols., 1996; Eilts, 2005; Hori y cols., 2005) y no por palpación transabdominal. Si bien, este método garantiza con completa seguridad que el semen se deposita en el interior del útero, necesita para su realización personal cualificado y un equipamiento más complejo que la técnica empleada por

nosotros; además, requiere que el animal se encuentre sedado o completamente anestesiado para poder manipularlo.

Finalmente, también encontramos ventajas al comparar nuestro procedimiento con las técnicas que tradicionalmente se han utilizado para realizar inseminaciones intravaginales en la especie canina (Silva y cols., 1996; Klinc y cols., 2005; Nöthling y cols., 2005). Si bien, este método es el más rápido y económico, puesto que la deposición del semen se realiza en el fondo vaginal, su utilidad prácticamente se encuentra reducida a la realización de inseminaciones en fresco; en el caso del semen congelado, éste tiene disminuida su vida fértil (Rota y cols., 1999a) y por otro lado, precisa vencer la dificultad mecánica que representa atravesar el cuello uterino y posteriormente progresar por el cuerno uterino antes de encontrarse en su desplazamiento hasta el óvulo, generando que la proporción de hembras gestantes sea menor. En otras especies, se ha demostrado que uno de los principales factores que reducen la fertilidad del semen congelado es el lugar de deposición del semen, utilizando la misma dosis de espermatozoides, la fertilidad es mayor si el semen se deposita en el interior del útero, que si se realiza transcervical o intravaginal profundo (Leboeuf y cols., 2000).

#### 5.2.4.2. Momento de inseminación

Cuando se utiliza semen congelado, se recomienda realizar la inseminación 1 ó 2 días después del pico de LH y repetir al menos una inseminación más, 1 día después (Farstad, 2000a, b). El pico de LH se determina principalmente realizando una medición de las concentraciones plasmáticas de progesterona, siendo lo más ampliamente aceptado que el pico de LH ocurre cuando se detectan entre 4-8 ng/mL (Kustritz, 2005a) aunque otros autores consideran que este pico ocurre cuando la progesterona sérica es  $\geq 2$  ng/mL (Rota y cols., 1999a; Jeffcoate, 2000; Eilts y cols., 2005).

Sin embargo, en nuestra experiencia, tuvimos en cuenta otra serie de criterios a la hora de decidir el momento óptimo de realizar la inseminación; de esta forma, nos orientamos más por el resultado observado en la citología vaginal, la receptividad que mostraba la hembra frente al cortejo del macho, la coloración de la mucosa vaginal, así como la facilidad a la hora de introducir el catéter por el cuello uterino; finalmente, se tomaron muestras sanguíneas para la determinación de progesterona sérica. De hecho, se conjugaron los resultados de todos los parámetros anteriores para determinar en qué momento comenzar con el periodo de inseminaciones, salvo la medición de progesterona sérica que se determinó al finalizar la

experiencia. Con todo ello pretendíamos evaluar si estos procedimientos podían ser alternativos o al menos compatibles con la medición hormonal de progesterona sérica.

Con respecto a la citología vaginal, cuando comenzaba el proestro, las citologías de las diferentes hembras mostraban una gran variedad, si bien el patrón común era que comenzaban a aumentar las células intermedias grandes en detrimento de las pequeñas y parabasales y, en algunos animales ya comenzaban a presentarse las primeras superficiales. El día que decidimos realizar la primera inseminación todas las hembras presentaban un 80% o más de células superficiales y una ausencia total de parabasales e intermedias pequeñas. Nuestro criterio se basaba principalmente en que al ser el celo de una duración un poco más corta al ocurrido fisiológicamente, los estratos celulares presentaban modificaciones más rápidas, por lo que considerábamos que este porcentaje era el mínimo que debía presentarse para comenzar a inseminar. Kustritz (2005a) considera que la hembra se encuentra en estro, cuando el 90% de las células presentes son cornificadas (superficiales); en nuestra experiencia, el día que se realizó la primera inseminación artificial todas las hembras mostraban más de un 80 % de células superficiales, y la mitad de ellas mostraban más del 90% de este tipo celular, por lo que nuestro criterio a la hora de determinar el momento del ciclo en que se encontraba la hembra es compatible con el definido por este autor.

En cuanto a otras manifestaciones externas observadas en las hembras utilizadas en nuestro estudio, como el tratamiento de inducción con cabergolina se administraba a diario, la observación de la vulva, mucosa y secreciones vaginales se realizaba siempre en el mismo momento de la administración de este fármaco. El primer día de proestro observábamos como la vulva había aumentado de tamaño, la mucosa vaginal se tornaba de una coloración rojiza más intensa y se producía una descarga sanguínea evidente. Estos cambios iban incrementándose conforme avanzaba el proestro, y consideramos el primer día del estro cuando la vulva se encontraba totalmente edematizada, la mucosa mostraba una tonalidad más pálida y la descarga vaginal era escasa e incluso ausente. Estos síntomas son coincidentes con los descritos por otros autores cuando describen estos mismos momentos del ciclo sexual de la hembra de la especie canina (Kustritz, 2005a). Asimismo, a partir de la segunda mitad del proestro, se valoraba diariamente la aceptación de la hembra frente al cortejo del macho, definiendo el periodo de inseminaciones cuando la perra aceptaba claramente el cortejo del macho.

Por otro lado, como ya se ha definido previamente, aunque tomamos muestras sanguíneas los mismos días y con la misma frecuencia que las citologías vaginales, la determinación de progesterona plasmática no se realizó hasta finalizado todo el periodo de extracciones. Las determinaciones hormonales mediante radioinmunoensayo tenían como objetivo la confirmación del momento concreto del ciclo estral en que se encontraban las hembras cuando se realizaron las inseminaciones artificiales, y sí la utilización conjunta del resto de parámetros como indicadores del momento óptimo de inseminación era asimilable a la determinación de los niveles plasmáticos de progesterona. Es interesante señalar que las hembras que quedaron preñadas mostraban valores séricos de progesterona ligeramente inferiores a los descritos en la bibliografía, destacando que valores superiores a 6 ng/mL sólo se presentaron en las últimas inseminaciones de alguna de las hembras que quedaron gestantes y, que curiosamente la hembra (perra 7) que proporcionó la camada más numerosa (6 cachorros) no llegó a mostrar en ningún momento valores de progesterona superiores a 5 ng/mL durante el periodo de inseminaciones.

#### **5.2.5. Tasa de gestación y prolificidad final**

Del total de hembras que quedaron gestantes (4/10), el 50 % de las camadas obtenidas fueron resultado de inseminaciones con semen congelado y conservado en el ultracongelador de -152 °C y el otro 50% fueron obtenidas de semen congelado y conservado con nitrógeno líquido. En la mayoría de los trabajos, donde se describen altos porcentajes de gestaciones realizando tratamientos farmacológicos de inducción del estro, se utiliza semen fresco en las inseminaciones o incluso la monta natural (Verstegen y cols., 1999; Rota y cols., 2003).

Cuando se utiliza semen congelado, la mayoría de los autores realizan inseminación artificial por vía laparoscópica (Silva y Verstegen, 1995; Silva y cols., 1996; Rota y cols., 1999a; Hori y cols., 2005), oscilando el porcentaje de gestación obtenido entre un 60-100% (Silva y Verstegen, 1995; Silva y cols., 1996; Rota y cols., 1999a; Verstegen y cols., 1999). Por tanto, nuestro resultado se encuentra dentro de un rango asumible, si tenemos en cuenta que nuestra experiencia entrañaba distintas variables importantes con respecto a la fertilidad, ya que se trabajaba conjuntamente con animales a los que se les había inducido el celo de forma farmacológica, el semen utilizado en las inseminaciones era semen crioconservado y la deposición del semen se realizaba con un catéter de inseminación modificado. La mayoría de los estudios que realizan una inducción farmacológica del celo con agonistas de la dopamina, obtienen unos porcentajes de gestación que oscilan entre un 60 y un 100% (Verstegen y cols.,

1999; Rota y cols., 2003; Kutzler, 2005b), pero en todos estos estudios, las hembras son cubiertas por monta natural o inseminadas con semen fresco. Del mismo modo, la tasa de gestación obtenida tras tratamientos inducidos a base de gonadotropinas (eCG), se viene a situar entre un 60 y un 100%, pero en estos tratamientos, las hembras se inseminan con semen fresco o bien son cubiertas de forma natural (Archbald y cols., 1980; Chaffaux y cols., 1984).

Durante esta experiencia, se quedaron gestantes el 40% de las hembras, llegando todas las gestaciones a término. Se obtuvieron 4 camadas: las dos resultado de inseminación con semen crioconservado en el ultracongelador de -152 °C, mostraron unos valores menos uniformes (2 y 6 cachorros, respectivamente), que los obtenidos tras inseminar con semen congelado con nitrógeno líquido (5 y 4 cachorros, respectivamente). A la vista de los resultados, el ultracongelador, aunque muestra valores más heterogéneos, se muestra como una alternativa completamente válida frente al uso del nitrógeno líquido para crioconservar semen que permanezca fértil a lo largo del tiempo. Es posible que esta disparidad en los resultados obtenidos, pueda deberse tanto a factores propios de la hembra, como al hecho de que probablemente fuese necesario concretar con mayor precisión el momento óptimo a la hora de realizar las inseminaciones de las perras inducidas. Nuestro resultado es comparable al obtenido por otros autores que inducen el celo mediante el uso de cabergolina, obteniendo en estos trabajos un tamaño medio de camada de 5 cachorros, pero a diferencia de nosotros estos autores realizan monta natural (Verstegen y cols., 1999; Rota y cols., 2003).

En otros estudios (Silva y Verstegen, 1995; Nöthling y cols., 1997; Rota y cols., 1999a) se han obtenido camadas tras realizar inseminaciones artificiales (intrauterina o intracervical) con semen congelado en nitrógeno líquido, oscilando la prolificidad media entre 2 y 5 cachorros/hembra; estos resultados son comparables a los observados en nuestra experiencia, si bien en todos estos estudios no indujeron el celo de las hembras sino que fueron siempre estros fisiológicos. Finalmente, hay estudios donde el tamaño medio de camada obtenido con semen refrigerado durante 24 y 48 horas, era de aproximadamente 7 cachorros en ambos casos; en este caso, las hembras utilizadas salieron en celo de manera fisiológica (Pinto y cols., 1999).

Finalmente, en nuestro estudio observamos que si bien el celo obtenido era similar al fisiológico, tanto el proestro como el estro eran ligeramente más cortos que cuando el celo se manifiesta de manera fisiológica. De hecho, Kutzler (2005b) concluye que existen muchos protocolos para inducir el estro en la perra; pero la fertilidad observada con los estros inducidos

es variable, destacando el hecho de que algunos tratamientos son muy caros, laboriosos e incluso experimentales, por lo que no tienen una gran aplicabilidad clínica. En nuestro estudio, y tal como se ha apuntado previamente, sería factible proponer que la tasa de fertilidad obtenida podría deberse básicamente a la combinación de dos circunstancias: por un lado, la utilización de semen congelado, que evidentemente tiene reducida su vitalidad en comparación con la utilización del semen fresco o la monta natural, y por otro lado, las hembras fueron inseminadas tras someterse a un tratamiento farmacológico para inducirles el celo de manera artificial.

## 6. CONCLUSIONES



## 6. CONCLUSIONES

1. La utilización exclusiva de ultracongeladores de  $-152\text{ }^{\circ}\text{C}$  para congelar y conservar el semen canino se presenta como una opción completamente válida que garantiza resultados satisfactorios de motilidad, vitalidad, acrosomías y morfoanomalías post-descongelación.
2. La utilización de ultracongeladores de  $-152\text{ }^{\circ}\text{C}$  simplifica el método de congelación del semen canino, reduciendo el tiempo y manejo empleados en el procedimiento de congelación mediante nitrógeno líquido.
3. La motilidad individual progresiva y la vitalidad espermática post-descongelación fueron equiparables entre las muestras crioconservadas en nitrógeno líquido y las crioconservadas en ultracongelador de  $-152\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a lo largo del periodo experimental.
4. No se detectaron diferencias significativas en los porcentajes de acrosomías post-descongelación entre muestras congeladas y conservadas mediante la utilización de nitrógeno líquido y aquellas dosis crioconservadas mediante el ultracongelador de  $-152\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
5. Los resultados más elevados de motilidad espermática y morfoanomalías post-descongelación se obtuvieron en las dosis seminales que presentaban una concentración final de glicerol del 6%, tanto en el protocolo de nitrógeno líquido como en la técnica del ultracongelador de  $-152\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
6. Tanto con nitrógeno líquido como con ultracongelador de  $-152\text{ }^{\circ}\text{C}$ , los resultados de vitalidad espermática y acrosomías post-descongelación no fueron significativamente diferentes entre muestras con distinta concentración de glicerol.
7. En la mitad de los ejemplares se constató un notable empeoramiento de la calidad del semen tras 6-12 meses de criopreservación, presentando un comportamiento muy parecido entre los diferentes procedimientos de crioconservación.

8. Los resultados de motilidad y vitalidad espermática post-descongelación mostraron que existían ejemplares con mejor predisposición para someterse a los procedimientos de congelación y conservación seminal, independientemente del método de congelación empleado.

9. El porcentaje de morfoanomalías post-descongelación fue el parámetro que menos variación individual presentaba entre ejemplares, con independencia del protocolo de criopreservación, la concentración final de glicerol en el diluyente o el tiempo de conservación.

10. La administración de cabergolina (0.005 mg/kg/día) se mostró como una técnica válida para inducir la presentación de manifestaciones estrales en la totalidad de las hembras, en un plazo medio de 26.8 días tras el inicio del tratamiento, sin generar efectos secundarios indeseables.

11. Durante el tratamiento de inducción, la evolución de los frotis vaginales mostró un comportamiento similar en todas las hembras, presentando un descenso progresivo del porcentaje de células parabasales y un incremento del porcentaje de células intermedias.

12. El porcentaje de células superficiales siempre fue superior al 80% durante el periodo de inseminaciones, siendo este hallazgo coincidente con un aspecto mayoritariamente pálido de la mucosa vaginal.

13. Los niveles de progesterona plasmática siempre fueron inferiores a 0.6 ng/mL durante el tratamiento de inducción, experimentaron un progresivo incremento durante el proestro (valores entre 0.9 y 2.9 ng/mL), fueron superiores a 5 ng/mL en el estro en 9 de las 10 hembras y se incrementaron significativamente en el diestro.

14. La utilización conjunta de la citología vaginal, la valoración del aspecto de la mucosa vaginal, el grado de receptividad de la hembra y la progresión del catéter de inseminación a través del cuello uterino, permitieron detectar con relativa exactitud el momento óptimo de inseminación.

15. La tasa de gestación y la prolificidad fueron similares entre aquellas hembras inseminadas con semen crioconservado con nitrógeno líquido y las inseminadas con semen criopreservado en ultracongelador de  $-152\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

16. Los resultados mostraron que el ultracongelador de  $-152\text{ }^{\circ}\text{C}$  mantiene la viabilidad espermática y su capacidad fertilizante de manera similar a la técnica tradicional con nitrógeno líquido.

## 7. RESUMEN

## 7. RESUMEN

Este trabajo de investigación pretendía establecer si la utilización de ultracongeladores de -152 °C era un protocolo válido para la criopreservación de semen canino a medio y largo plazo. Para ello, se llevaron a cabo una serie de pruebas *in vitro* e *in vivo* para valorar la calidad seminal tras diferentes protocolos de congelación y conservación.

Las pruebas *in vitro* se desarrollaron para valorar las características seminales post-descongelación a lo largo de tiempo. Para ello, se utilizaron 8 perros de diferentes razas a los que se les recogía la segunda fracción del eyaculado; posteriormente, cada eyaculado se sometía a los procedimientos de diluyo-conservación de manera individualizada, hasta obtener una dilución con un concentración final de  $100 \times 10^6$  espermatozoides/mL, 0.5% de Equex y un 5-6% de glicerol. En este momento, el semen de cada ejemplar era sometido a los siguientes protocolos de crioconservación: (1) congelación y conservación en nitrógeno líquido, con un 5% de glicerol; (2) congelación y conservación en ultracongelador de - 152 °C, con un 5% de glicerol; (3) congelación y conservación en nitrógeno líquido, con un 6% de glicerol; (4) congelación y conservación en ultracongelador de - 152 °C, con un 6% de glicerol. El número total de congelaciones realizadas fue de 15, hasta obtener un total de 160 pajuelas por perro. Posteriormente, las muestras se descongelaban los días 1, 30, 90, 180 y 365 post-congelación, valorándose la motilidad individual progresiva, la vitalidad espermática, así como el porcentaje de morfoanomalías y acrosomías; con ello perseguíamos confirmar la eficacia del ultracongelador para mantener la viabilidad del semen a largo plazo y comprobar si existían diferencias en la calidad seminal entre individuos.

Para la realización de las pruebas *in vivo*, se utilizaron un total de 8 hembras de la raza Beagle. En esta segunda fase pretendíamos valorar la fertilidad de las muestras seminales congeladas con ambos procedimientos (ultracongelador de - 152 °C y nitrógeno líquido, con una concentración final de glicerol del 5%), así como comprobar la fiabilidad de la citología vaginal y de otras manifestaciones estrales para determinar el momento óptimo de inseminación artificial en la especie canina. El celo se indujo en las hembras mediante la administración oral de cabergolina a una dosis de 5 µg/kg/día. Por otro lado, desde el inicio del tratamiento hasta 8 días después de finalizadas las inseminaciones artificiales, se tomaron muestras seriadas para citología vaginal y se realizaron extracciones sanguíneas para la determinación de progesterona sérica. Una vez definido el momento óptimo de inseminación, las inseminaciones se realizaron

mediante la utilización de un catéter rígido de inseminación, manipulado por palpación transabdominal, depositando el semen en el interior del útero (concentración total de  $100 \times 10^6$  espermatozoides/día de inseminación). Se realizaron un total de 4 inseminaciones, en días consecutivos, a cada una de las hembras empleadas en el estudio. El diagnóstico de gestación se realizó mediante ecografía entre 26 y 28 días tras la última inseminación.

En cuanto a la motilidad post-descongelación, en la casi totalidad de los machos, la motilidad espermática no sufrió modificaciones en los primeros tres meses tras la congelación y como norma general, los resultados de motilidad más elevados se obtuvieron cuando se utilizaba un diluyente con un 6% de glicerol final. A los 6 meses de criopreservación, los valores observados mostraron mayor variabilidad, presentándose en algunos individuos (perros 2, 4, 5 y 7) motilidades inferiores al 30%. De todos los animales empleados, sólo los individuos 3, 5 y 8 mostraron valores de motilidad post-descongelación elevados (rango: 50-75%), que se mantuvieron relativamente constantes durante todo el periodo experimental. El resto de individuos, en general, mostró un ligero descenso en los valores de motilidad a partir del 6º mes de conservación, disminuyendo significativamente 12 meses tras la criopreservación. No se detectaron diferencias significativas en la calidad seminal post-descongelación, tras la utilización de nitrógeno líquido o ultracongeladores de  $-152\text{ }^{\circ}\text{C}$  para congelar y conservar el semen.

Con respecto a la vitalidad espermática post-descongelación, durante los 3 primeros meses los valores de vitalidad fueron siempre superiores al 70% en todos los individuos, con independencia del método de congelación y de la concentración final de glicerol en el diluyente empleado. Tras 180 días de conservación, los porcentajes medios de vitalidad mostraron un ligero descenso, presentando las muestras que se congelaron con un 6% de glicerol, una vitalidad ligeramente superior que cuando se empleó una concentración de glicerol menor. Finalmente, las mayores diferencias se observaron a los 365 días de criopreservación, puesto que si bien existían ejemplares que seguían manteniendo niveles superiores al 70%, en otros perros, los resultados oscilaban entre 15-50%.

Finalmente, en cuanto a las morfoanomalías y acrosomías, los valores que se presentaron fueron inferiores al 25% y al 20%, respectivamente. El porcentaje de morfoanomalías no manifestaba una distribución uniforme en su presentación, si bien hubo mayor proporción de muestras con porcentajes  $>10\%$  en aquellas pajuelas con mayor concentración final de glicerol. En cuanto a las acrosomías, los perros 3, 5 y 8 mostraron

porcentajes inferiores al 10% durante todo el periodo experimental y para todos los protocolos de congelación valorados; el resto de los animales exhibía valores superiores al 10% de acrosomías en diferentes momentos del periodo experimental en función del individuo, del protocolo empleado y de la concentración de glicerol presente en el diluyente.

Los resultados *in vitro* demostraron que aunque el protocolo de congelación con nitrógeno líquido está estandarizado en la especie canina, el uso del ultracongelador de -152 °C puede ser un método completamente válido a la hora de crioconservar semen canino a medio y largo plazo. Ambos procedimientos mostraron una eficacia parecida para conservar el semen canino, presentando un comportamiento prácticamente similar en los periodos testados. Con respecto al porcentaje de glicerol empleado, si bien es cierto que la motilidad tenía valores ligeramente superiores con una mayor concentración de glicerol, el resto de los parámetros valorados no mostraba grandes diferencias entre sí. Si consideramos el tiempo de almacenamiento, se observaba que en general, tras 6 meses de conservación, se producía un notable empeoramiento en los parámetros de motilidad y vitalidad, más evidente en aquellas muestras con menor concentración de glicerol. Finalmente, también evidenciamos que de los 8 machos empleados en el estudio, 3 de ellos mostraban mejor predisposición para someterse a los procedimientos de diluyo-conservación y congelación seminal, manteniendo un rango de valores elevados y prácticamente constantes a lo largo del tiempo, mientras que el resto de los animales mostraban un empeoramiento de la calidad seminal conforme avanzaba el tiempo de conservación de la muestra, independientemente del método de congelación empleado.

Con referencia a las pruebas *in vivo*, la administración de cabergolina consiguió inducir el celo a la totalidad de las hembras, en un plazo medio de 4 semanas, sin provocar efectos secundarios. Con respecto a los resultados observados en las citologías vaginales, se detectaban variaciones entre unas hembras y otras; sin embargo, el patrón general observado en anoestro mostraba un predominio de células parabasales, en proestro las células intermedias eran las que se presentaban en mayor número y, finalmente, en estro las células superficiales eran las que aparecían en mayor proporción, oscilando el número entre 80-95%. Las inseminaciones se llevaron a cabo cuando en el frotis vaginal se presentaban como mínimo un 80% de células superficiales y ausencia de células parabasales. De la misma forma, consideramos que el momento óptimo de inseminación quedaba concretado, cuando la mucosa vaginal se tornaba pálida y la descarga vaginal de sangre era escasa o ausente. Además, se valoraba la receptividad de la hembra hacia el cortejo del macho y la facilidad para atravesar el

cuello del útero, como factores adicionales a la hora de determinar el mejor momento para realizar la primera inseminación. La duración media del proestro y estro en la totalidad de los animales inducidos se situó en  $6.7 \pm 0.3$  y  $4.6 \pm 0.2$  días, respectivamente.

La determinación plasmática de progesterona se realizó mediante radioinmunoensayo al final del periodo experimental. Como regla general, en anoestro todas las hembras mostraron valores inferiores a 0.6 ng/mL; durante el periodo del proestro, la totalidad de las hembras experimentaron un incremento de las concentraciones plasmáticas de progesterona, hasta alcanzar el último día de proestro, unos niveles medios de 1.6 ng/mL (rango: 0.9-2.9 ng/mL). En el momento en que se realizaron las inseminaciones, las hembras presentaban entre 1.8-14.5 ng/mL y finalmente, entre 7 y 8 días tras finalizar el periodo de celo, el valor medio ( $\pm$  SEM) de progesterona plasmática se situó entre  $39.2 \pm 3.2$  ng/mL.

El diagnóstico de gestación, realizado entre 26 y 28 días tras la última inseminación, determinó que 4 de las 10 hembras se habían quedado gestantes: 2 animales habían sido inseminadas con semen crioconservado en ultracongelador de  $-152$  °C y otras dos hembras, con semen crioconservado con nitrógeno líquido. Asimismo, si bien el tamaño de la camada fue más homogéneo cuando se utilizaron muestras criopreservadas en nitrógeno líquido, la prolificidad fue similar para ambos procedimientos (4.5 *versus* 4.0, NL *vs* ULF, respectivamente).

No encontramos una correlación definida entre el porcentaje de células superficiales presentes en el frotis vaginal y los niveles plasmáticos de progesterona durante el periodo de inseminaciones. No obstante, la utilización conjunta de la citología vaginal, la observación de la mucosa vaginal y la facilidad para atravesar el cuello uterino, son pruebas que (aunque con menor exactitud que los niveles plasmáticos de progesterona) pueden ser indicadores del momento óptimo de inseminación.

Los resultados obtenidos en este trabajo experimental (*in vitro* e *in vivo*) ponen de manifiesto que el uso del ultracongelador de  $-152$  °C es un procedimiento completamente válido para mantener la viabilidad del semen conservado a lo largo del tiempo, siendo los resultados obtenidos comparables a los observados cuando se emplea nitrógeno líquido como protocolo de crioconservación seminal.



## 8. SUMMARY

## 8. SUMMARY

The aim of our investigation has been to determine whether a -152 °C ultra-freezer could be a way of preserving canine semen during short and long-term storage periods. With this in mind a series of studies were completed to evaluate the condition of semen of both *in-vitro* and *in-vivo* using alternative freezing and preservation protocols.

*In vitro* experiments were developed in order to check the post-thaw seminal quality in particular periods of time. For this purpose, 8 dogs of different breeds were used and their second ejaculate fraction suitably diluted for individual preservation with final concentrations of  $100 \times 10^6$  spermatozoa/mL, 0.5% Equex and 5-6% glycerol. Each individual sample of semen was then subject to the following cryopreservation protocol alternatives: (1) freezing and preservation in liquid nitrogen and 5% glycerol; (2) freezing and preservation in a -152 °C ultra-freezer with 5% of glycerol; (3) freezing and preservation in liquid nitrogen with 6% glycerol; and (4) freezing and preservation in a -152 °C ultra-freezer with 6% glycerol. The samples (160 straws per dog) were subsequently thawed on days 1, 30, 90, 180 and 365 after freezing and the sperm motility and the percentage of live spermatozoa were evaluated; in addition, acrosome membrane integrity and the percentage of abnormal sperm cells were also defined.

*In vivo* trials (n= 8 female beagles) were carried out to evaluate the fertility of preserved semen samples (ultra-freezer *versus* liquid nitrogen, final glycerol concentration of 5%) and also to verify the reliability of vaginal cytology and of other possible oestrus-related manifestations to establish the optimal moment for artificial insemination. Estrus was induced using oral cabergoline in doses of 5 µg/kg/daily. On the other hand, from the beginning of the cabergoline treatment up to 8 days after the last artificial insemination, samples were taken for vaginal cytology, in addition to some blood samples to define the plasma levels of progesterone. When the optimal insemination period had been established, inseminations were carried out with a rigid insemination catheter, which was guided trans-abdominally, for intrauterine deposition of the semen ( $100 \times 10^6$  spermatozoa/daily); bitches were inseminated during 4 consecutive days. Four weeks after the last insemination, pregnancy diagnosis was performed by ultrasonography.

Regarding motility following the freezing process, during the first 3 months of preservation, the sperm motility did not show any variation in most of the samples. The highest motility values were generally registered when a final dilution with 6% glycerol was used. After 6

months of cryopreservation, the motility values recorded showed greater variability and in some individual cases (dogs 2, 4, 5 and 7) they were actually below 30%. Males 3, 5 and 8 showed high motility values (range: 50-75%), which were also maintained during our whole experimental period. The remaining males generally showed a slight reduction in motility values after 6 months of preservation and there was a significant reduction in their seminal motility after 12 months. However, no significant differences in sperm motility were recorded between the liquid nitrogen protocol and the -152°C ultra-freezer.

The percentage of live spermatozoa was always above 70% for all dogs during the first 3 months, regardless of the freezing protocol and the glycerol concentration used. After 180 days of preservation, the average viability percentages showed a slight reduction, but samples frozen with 6% glycerol had slightly higher values than those frozen with a lower glycerol concentration. Finally, more significant differences were observed after 365 days of cryopreservation (individual range: 15-70% of live spermatozoa). Acrosome membrane integrity and the percentage of abnormal sperm cells were found to fall below 20% and 25%, respectively. The percentage of morphological abnormalities did not show a uniform pattern; a higher proportion of abnormal cells in the semen samples having a 6% final concentration of glycerol was however detected. With regard to the acrosome anomalies, dogs 3, 5 and 8 had values <10% both during the total period of the experiment and with all the different freezing protocols. The remaining males showed values of acrosomal defects higher than 10% at different times during the experimental period.

*In vitro* results showed that whereas the liquid nitrogen protocol is standard for the canine species, the - 152 °C ultra-freezer can be a potential alternative for long term preservation of canine semen. Both protocols have proved to be of similar efficacy in the preservation of canine semen. With regard to the percentage of glycerol used, although it is true that resulting sperm motility values were slightly higher with a greater glycerol concentration, the remaining parameters examined did not show any significant differences. Concerning periods of storage, some deterioration of the vitality and motility parameters was detected after 6 months of preservation. Finally, it became evident that 3 of the 8 males showed a high seminal quality that remained practically unaltered over long periods of time, whereas the values relating to the remaining animals showed that there was increased deterioration in the seminal quality as the length of the preservation period was extended, regardless of the freezing protocol used.

Regarding the *in vivo* experiments, cabergoline treatment induced estrus in all the females within an average of 4 weeks and had no side-effects. The general pattern of vaginal cytology observed during the anoestrus period showed a predominance of parabasal cells, whereas during proestrus it was found that intermediate cells were the predominant cell type (49.7%). Finally, during the oestrus period the more numerous cell type were the superficial cells, which amounted between 80% and 95%. The inseminations were made when the vaginal smear showed a minimum of 80% of superficial cells and total absence of parabasal cells. In the same way, we defined the optimum insemination time to be when vaginal mucose turned pale, the female did not refuse the male and the cervix could be easily penetrated with the rigid insemination catheter. The average proestrus and estrus periods were found to be between  $6.7 \pm 0.3$  and  $4.6 \pm 0.2$  days, respectively.

Plasma levels of progesterone were determined by radioimmunoassay. During anoestrus period, all females showed plasma values of less than 0.6 ng/mL and in proestrus the bitches experimented increase in the plasmatic progesterone concentration levels that reached average levels of 1.6 ng/mL (ranging from 0.9 to 2.9 ng/mL) the last day of proestrus. On insemination period, the values ranged between 1.8 and 14.5 ng/mL. Finally, 8 days after the period of estrus, the average level of plasmatic progesterone reached ( $\pm$  SEM)  $39.2 \pm 3.2$  ng/mL.

Pregnancy diagnosis showed that 4 out of the 10 females had become pregnant: two females had been inseminated with the semen preserved in a ultra-freezer at  $-152$  °C whereas in another 2 bitches the semen had been preserved in liquid nitrogen. Although the litter size was more homogeneous when samples preserved in liquid nitrogen were used, no significant differences were observed within both procedures (4.5 and 4.0, NL *vs.* ULF, respectively).

A correlation between the percentage of superficial cells found in the vaginal smears and the level of plasmatic progesterone did not exist during the insemination period. Nevertheless, a simultaneous study of the vaginal cytology, the appearance of the vaginal mucous and the ease with which the uterus neck could be penetrated proved to be an accurate indication of the optimum moment for insemination, admittedly with slightly less accuracy than those defined by the plasmatic progesterone levels.

The results obtained (*in-vitro* and *in-vivo*) show that the  $-152$  °C ultra-freezer could be a completely valid way of guaranteeing the viability of preserved semen.

## 9. BIBLIOGRAFIA

## 9. BIBLIOGRAFIA

Álamo D (2003): Congelación y Conservación del Semen en la Especie Canina: Utilización de Ultracongeladores como Técnica Alternativa al Nitrógeno Líquido. *Tesina de Grado, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria*.

Álamo D, Batista M, González F, Rodríguez N, Cruz G, Cabrera F, Gracia A (2005): Cryopreservation of semen in the dog: use of ultra-freezers of -152 °C as a viable alternative to liquid nitrogen. *Theriogenology*, 63: 72-82.

Albarracín JL, Mogas T, Palomo MJ, Peña A, Rigau T, Rodríguez-Gil JE (2004): *In vitro* capacitation and acrosome reaction of dogs spermatozoa can be feasibly attained in a defined medium without glucosa. *Reprod. Dom. Anim.*, 39: 129-135.

Allen WE (1992): Fertility and Obstetrics in the Dog. Ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp: 33-55; 136-140.

Allen WE, Meredith MJ (1981): Detection of pregnancy in the bitch: a study of abdominal palpation, A-mode ultrasound and Doppler ultrasound techniques. *J. Small Anim. Pract.*, 22: 609-621.

Anchordoguy TJ, Rudolph AS, Carpenter JF, Crowe JH (1987): Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology*, 24: 324-331.

Andersen K (1980): Artificial insemination and storage of canine semen. En: Current Therapy in Theriogenology (Morrow DA). Ed. WB Saunders, Philadelphia; pp: 661-665.

Arbeiter K, Brass W, Ballabio R, Jochle W (1988): Estrus induction and fertility with cabergoline, a prolactin inhibitor, in the bitch. *J. Small Anim. Pract.*, 29: 781-788.

Archbald LF, Baker BA, Clooney LL, Godke RA (1980): A surgical method for collecting canine embryos after induction of estrus and ovulation with exogenous gonadotropins. *Vet. Med. Small Anim. Clin.*, 75: 230-238.

Armitage WJ (1986): Osmotic stress as a factor in the detrimental effect of glycerol on human platelets. *Cryobiology*, 23: 116-125.

Arnold S, Arnold P, Concannon PW, Weilenmann R, Hubler M, Casal M, Dobeli H, Fairburn A, Eggenberger E, Rusch P (1989): Effects of duration of PMSG treatment on induction of estrus, pregnancy rates and the complications of hyperestrogenism in dogs. *J. Reprod. Fertil. (Suppl.)*, 39: 115-122.

Arthur GH, Noakes DE, Pearson H (1991): Reproducción y Obstetricia en Veterinaria. Ed. Interamericana McGraw-Hill, México, pp: 563-579.

Badinand F, Fontbonne A, Adoue C (1990): Préparation, conditionnement, conservation et utilisation de la semence du chien en insémination artificielle. *El. Et. Ins.*, 239: 15.

- Barth AD, Oko RJ (1989): Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa. Ed. Iowa State University Press/Ames, Iowa, pp: 8-18.
- Batista M, González F, Cabrera F, Forga J, Gracia A (1998): Segmental aplasia of the epididymis in a Siberian Husky. *The Veterinary Record*, 142: 250-251.
- Batista M, González F, Cabrera F, Calero P, Gracia A (2000): Morphologic and endocrinologic characteristics of retained canine testes. *Canine Practice*, 25: 12-15.
- Batista M, Alamo D, González F, Cruz MG, Gracia A (2006): Influence of freezing technique (nitrogen liquid vs ultrafreezer of -152 °C) and male-to-male variation over the semen quality in Canarian Mastiff breed dogs. *Reprod. Dom. Anim.*, 41: 423-428.
- Bearden HJ, Fuquay JW (1997): Applied Animal Reproduction. Ed. Prentice-Hall, New Jersey, pp: 147-157.
- Beijerink NJ, Dieleman SJ, Kooistra HS, Okkens AC (2003): Low doses of bromocriptine shorten the interestrous interval in the bitch without lowering plasma prolactin concentration. *Theriogenology*, 60: 1379-1386.
- Beijerink NJ, Kooistra HS, Dieleman SJ, Okkens AC (2004): Serotonin antagonist-induced lowering of prolactin secretion does not affect the pattern of pulsatile secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in the bitch. *Reproduction*, 128: 181-188.
- Boucher JM, Foote RH, Kirk RW (1958): The evaluation of semen quality in the dog and the effects of frequency of ejaculation upon sperm quality, libido and depletion of sperm reserves. *Cornell Vet.*, 48: 67-86.
- Burke TJ (1986): Small Animal Reproduction and Infertility. Ed. Lea and Febiger, Philadelphia, pp: 207-217.
- Cabrera F (1999): Producción y Congelación Seminal en la Variedad Majorera de la Agrupación Caprina Canaria. *Tesis Doctoral, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria*.
- Chaffaux S, Locci D, Pontois M, Deletang F, Thibier M (1984): Induction of ovarian activity in anoestrous Beagle bitches. *Br. Vet. J.*, 140: 191-195.
- Cheng FP, Wu JT, Tsai PS, Chang C LT, Lee SL, Lee WM, Fazeli A (2005): Effects of cryo-injury on progesterone receptor of canine spermatozoa and its response to progesterone. *Theriogenology*, 64: 844-854.
- Christiansen IJ (1984): Reproduction in the Dog and Cat. Ed. Baillière Tindall, Londres, pp: 12-21.
- Cinone M, Maricchiolo G, Aiudi G, Micale V, Muglia U (2005): Computerized analysis of the sperm cell kinetics in infertile dogs. *Reprod. Dom. Anim.*, 40: 383.

Concannon PW (1993): Biology of gonadotropin secretion in adult and prepubertal female dogs. *J. Reprod. Fertil. (Suppl.)*, 47: 3-27.

Concannon PW, Hansel W, McEntee K (1977): Changes in LH, progesterone and sexual behaviour associated with preovulatory luteinization in the bitch. *Biol. Reproduction*, 17: 604-613.

Concannon PW, Whaley S, Lein D, Wissler R (1983): Canine gestation length: variation related to time of mating and fertile life of sperm. *Am. J. Vet. Res.*, 44: 1819-1821.

Concannon PW, DiGregorio GB (1986): Canine vaginal cytology. En: Small Animal Reproduction and Infertility (TJ Burke). Ed. *Lea and Febiger*, Philadelphia, pp: 96-111.

Concannon PW, Weinstein P, Whaley S (1987): Suppression of luteal function in dogs by luteinizing hormone antiserum and by bromocriptine. *J. Reprod. Fertil.*, 81: 175-180.

Concannon PW, Battista M (1989): Canine semen freezing and artificial insemination. En: Current Veterinary Therapy (Kirk R). Ed. *WB Saunders*, Philadelphia, pp: 1247-1259.

Concannon PW, McCann JP, Temple M (1989): Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. *J. Reprod. Fertil. (Suppl.)*, 39: 3-25.

Concannon PW, England GC, Verstegen JP, Russell HA (1993): Fertility and Infertility in Dogs, Cats and Others Carnivores. Ed. *The Journals of Reproduction and Fertility Ltd.*, Cambridge, pp: 243-359.

Concannon PW, Verstegen J (1997): Estrus induction in dogs: use of gonadotropins, therapies and dopamine agonists. *Proc. Ann. Meet. Soc. Theriogenology*, Montreal, pp: 245-247.

Crowe JH, Crowe LM, Carpenter JF, Aurel Wistram C (1987): Stabilization of dry phospholipid bilayers and protein by sugars. *Biochem. J.*, 242: 1-10.

Curtó M (1991): El Perro de Presa Canario (Su verdadero origen). Ed. *Nueva Gráfica, SA*. La Laguna (Tenerife), pp: 27-86.

Daniels RB, Mundell PE (2005): LH surge determination as a useful adjunct in determining optimal mating time in the bitch. *Theriogenology*, 64: 814 (*Proceedings of the 2005 Annual Conference of the Society for Theriogenology*).

Edens M, Heath A (2005): Manejo de la reproducción en la perra y la gata. En: Manual de Reproducción del Perro y del Gato (Root Kustritz). *Multimédica Ediciones Veterinarias*, Barcelona, pp: 15-26.

Eilts BE (2005): Theoretical aspects of canine cryopreserved semen evaluation. *Theriogenology*, 64: 685-691.

Eilts BE, Davidson AP, Hosgood G, Paccamonti DL, Baker DG (2005): Factors affecting gestation duration in the bitch. *Theriogenology*, 64: 242-251.



England GC (1993): Cryopreservation of dog semen: a review. En: Fertility and Infertility in Dogs, Cats and Other Carnivores. Ed. PW Concannon, GC England, JP Verstegen, HA Russell, Cambridge, pp: 243-255.

England GC, Allen WE (1990): Studies on canine pregnancy using B-mode ultrasound: diagnosis of early pregnancy and the number of conceptuses. *J. Small Anim. Pract.*, 31: 321-323.

England GC, Allen WE, Porter DJ (1990): Studies on canine pregnancy using B-mode ultrasound: development of the conceptus and determination of gestational age. *J. Small Anim. Pract.*, 31: 324-329.

England GC, Ponzio P (1996): Comparison of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen. *Theriogenology*, 46: 165-171.

England GC (1999): Semen quality in dogs and the influence of a short-interval second ejaculation. *Theriogenology*, 52: 981-986.

England GC (2000): Control farmacológico de la reproducción en el perro. En: Manual de Reproducción y Neonatología en Pequeños Animales (GM Simpson, GC England, MJ Harvey). Ediciones S, Barcelona, pp: 267-295.

Evans HE, Christensen GC (1993): Miller's anatomy of the dog. En: The Urogenital System (Christensen GC, Evans HE). Ed. WB Saunders, Philadelphia, pp: 494-558.

Farstad W, Andersen-Berg K (1989): Factors influencing the success rate of artificial insemination with frozen semen in the dog. *J. Reprod. Fertil. (Suppl.)*, 39: 289-292.

Farstad W (2000a): Cubrición e inseminación artificial en el perro. En: Manual de Reproducción y Neonatología en Pequeños Animales (GM Simpson, GC England, MJ Harvey). Ediciones S, Barcelona, pp: 1125-1138.

Farstad W (2000b): Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology*, 53: 175-186.

Feldman EC, Nelson RW (1987): Canine female reproduction. En: Canine and Feline Endocrinology and Reproduction (Feldman EC, Nelson RW). Ed. WB Saunders, Philadelphia, pp: 399-480.

Fernandes PA, Bowen RA, Kostas AC, Sawyer HR, Nett TM, Olson PN (1987): Luteal function in the bitch: changes during diestrus in pituitary concentration and the number of luteal receptors for luteinizing hormone and prolactin. *Biol. Reproduction*, 37: 804-811.

Fogle B (1996): Enciclopedia del Perro. Ed Omega, Barcelona, pp: 6-35.

Fontbonne A (1990): Contribution à l'étude de la congélation du sperme canin: influence de la glycérolisation et de la Dilution. *Cit en:* Peña A (1997): Supervivencia y fertilidad del semen canino sometido a congelación-descongelación. *Tesis Doctoral, Universidad de Santiago de Compostela*.

- Fontbonne A, Badinand F (1993): Studies on freezing dog spermatozoa: effect of glycerol on motility after thawing. *J. Reprod. Fertil. (Suppl.)*, 47: 531-532.
- Fontbonne A (2006): News trends in imaging of the reproductive tract in dogs and cats. *Proceedings del 5<sup>th</sup> Biannual Congress, European Veterinary Society for Small Animal Reproduction*. Budapest, pp: 129-133.
- Foote RH (1962): Survival bull sperm in milk and yolk extenders with added catalase. *J. Dairy Sci.*, 45: 907-910.
- Foote RH, Arriola J (1987): Motility and fertility of bull sperm frozen-thawed differently in egg yolk and milk extenders containing detergent. *J. Dairy Sci.*, 70: 2642-2647.
- Frandsen RD, Spurgeon TL (1995): Anatomía y Fisiología de los Animales Domésticos. Ed. Interamericana McGraw-Hill, Méjico, pp: 386-409.
- Gil J, Gimeno M, Laborda J, Nuviola J (1997): Anatomía del Perro: Protocolos de Disección. Ed. Masson SA, Barcelona, pp: 440-449.
- Goodrich RP, Handel TM, Baldeschwieler JD (1988): Modification of lipid phase behavior with membrane-bound cryoprotectants. *Biochim. Biophys. Acta*, 938: 143-154.
- Haaften B, Dieleman SJ, Okkens AC, Bevers MM, Willemse AH (1989): Induction of estrus and ovulation in dogs by treatment with PMSG and/or bromocriptine. *J. Reprod. Fertil. (Suppl.)*, 39: 330-331.
- Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP (1990): Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive? *J. Androl.*, 11: 73-88.
- Hay MA, Goodrowe KL (1993): Comparative cryopreservation and capacitation of spermatozoa from epididymides and vasa deferentia of the domestic cat. En: Fertility and Infertility Dogs, Cats and Others Carnivores. Ed. PW Concannon, GC England, JP Versteegen, HA Russell, Cambridge, pp: 297-305.
- Hay MA, King WA, Gartley CJ, Leibo SP, Goodrowe KL (1997a): Canine spermatozoa-cryopreservation and evaluation of gamete interaction. *Theriogenology*, 48: 1329-1342.
- Hay MA, King WA, Gartley CJ, Leibo SP, Goodrowe KL (1997b): Effects of cooling, freezing and glycerol on penetration of oocytes by spermatozoa in dogs. *J. Reprod. Fertil. (Suppl.)*, 51: 99-108.
- Hayer P, Gunzel-Apel AR, Lüerssen D, Hoppen HO (1993): Ultrasonographic monitoring of follicular development, ovulation and the early luteal phase in the bitch. *J. Reprod. Fertil. (Suppl.)*, 47: 93-100.
- Hempling HG, White S (1984): Permeability of cultures magakaryocytopoietic cells of the rat to dimethylsulfoxide. *Cryobiology*, 21: 133-143.
- Hewitt DA (2000): Fisiología y endocrinología del macho. En: Manual de Reproducción y Neonatología en Pequeños Animales. (GM Simpson, GC England, MJ Harvey). Ediciones S, Barcelona, pp: 79-90.

- Hewitt DA, Leahy R, Sheldon IM, England GC (2001): Cryopreservation of epididymal dog sperm. *Anim. Reprod. Sci.*, 67: 101-111.
- Hishinuma M, Sekine J (2004): Separation of canine epididymal spermatozoa by percoll gradient centrifugation. *Theriogenology*, 61: 365-372.
- Hoffmann B, Büsges F, Engel E, Kowalewski MP, Papa P (2004): Regulation of corpus luteum-function in the bitch. *Reprod. Dom. Anim.*, 39: 232-240.
- Holt W, Medrano A, Thurston L, Watson P (2005): The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Theriogenology*, 63: 370-382.
- Holts PA, Plemister RD (1974): Onset of diestrus in the Beagle: bitch-definition and significance. *Am. J. Vet. Res.*, 35: 401-406.
- Hori T, Hagiuda K, Kawakami E, Tsutsui T (2005): Unilateral intrauterine insemination with prostatic fluid-sensitized frozen caudal epididymal sperm in Beagle dogs. *Theriogenology*, 63: 1573-1583.
- Howard J, Bush M, Wildt DE (1986): Semen collection analysis and cryopreservation in nondomestic mammals. En: Current Therapy in Theriogenology (Morrow DA). Ed. WB Saunders, Philadelphia, pp: 1047-1053.
- Iguer-ouada M (2001): Procréation Médicalement Assistée dans l'Espèce Canine: Analyse et Préservation à 4 °C du Sperme. *Tesis Doctoral, Universidad de Liège*. Bélgica.
- Iguer-ouada M, Verstegen JP (2001): Long-term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology*, 55: 671-684.
- Illera M (1984): Endocrinología Veterinaria y Fisiología de la Reproducción. Ed. Colibac, Madrid, pp: 209-315.
- Ivanova-Kicheva MG, Bobadov N, Somley B (1997): Cryopreservation of canine semen in pellets and in 5-ml aluminium tubes using three extenders. *Theriogenology*, 48: 1343-1349.
- Jeffcoate I (2000): Fisiología y endocrinología del macho. En: Manual de Reproducción y Neonatología en Pequeños Animales (GM Simpson, GC England, MJ Harvey). Ediciones S, Barcelona, pp: 1-14.
- Jeukenne P, Verstegen J (1997): Termination of diestrus and induction of oestrus in diestrus non pregnant bitches by the prolactin antagonist cabergoline. *J. Reprod. Fertil. (Suppl.)*, 51: 59-66.
- Johnston S, Kustritz M, Olson P (2001): Canine and Feline Theriogenology. Ed. WB Saunders, Philadelphia, pp: 1-104, 275-306.
- Jones RC (1969): Influence of diluents and processing times after ejaculation on the survival of deep-frozen ram spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.*, 22: 995-1004.

Kawakami E, Hori T, Tsutsui T (1998): Changes in semen quality and *in vitro* capacitation during various frequencies of semen collection in dogs with both asthenozoospermia and teratozoospermia. *J. Vet. Med. Sci.*, 60: 607-614.

Keenan L (2000): Infertilidad en el macho. En: Manual de Reproducción y Neonatología en Pequeños Animales (GM Simpson, GC England, MJ Harvey). *Ediciones S*, Barcelona, pp: 109-124.

Klinc P, Majdic G, Sterbenc N, Cebulj-Kadunc N, Butinar J, Kosec M (2005): Establishment of a pregnancy following intravaginal insemination with epididymal semen from a dog castrated due to benign prostatic hyperplasia. *Reprod. Dom. Anim.*, 40: 559-561.

Kiso Y, Yamauchi S (1984): Histochemical study on hydroxysteroid dehydrogenase in the trophoblast of dog placenta. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 46: 219-233.

Kooistra HS, Okkens AC, Bevers MM, Popp-Snijders C, Van Haften B, Dieleman SJ, Schoemaker J (1999): Bromocriptine-induced premature oestrus is associated with changes in the pulsatile secretion pattern of follicle-stimulating hormone in Beagle bitches. *J. Reprod. Fertil.*, 117: 387-393.

Kustritz MVR (2005a): Manual de Reproducción del Perro y del Gato. *Multimédica Ediciones Veterinarias*, Barcelona, pp: 15-26; 55-72; 93-106.

Kustritz MVR (2005b): Reproductive behavior of small animals. *Theriogenology*, 64: 734-746.

Kustritz MVR (2005c): Pregnancy diagnosis and abnormalities of pregnancy in the dog. *Theriogenology*, 64: 755-765.

Kutzler MA (2005a): Semen collection in the dog. *Theriogenology*, 64: 747-754.

Kutzler MA (2005b): Induction and synchronization of estrus in dogs. *Theriogenology*, 64: 766-775.

Leboeuf B, Restall B, Salamon S (2000): Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.*, 62: 113-141.

Linde-Forsberg C, Forsberg M (1989): Results of 527 controlled artificial inseminations in dogs. *J. Reprod. Fertil. (Suppl.)*, 47: 313-323.

Linde-Forsberg C, Holst BS, Govette G (1999): Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination with fresh and frozen-thawed dog semen: a retrospective study. *Theriogenology*, 52: 11-23.

Lindsay FE (1983): The normal endoscopic appearance of the caudal reproductive tract of the cyclic and non-cyclic bitch: post-uterine endoscopy. *J. Small Anim. Pract.*, 24: 1-15.

Manothaiudom K, Johnston SD, Hegstad RL, Hardy SK (1995): Evaluation of the accuracy of the ICAGEN-Target Canine Ovulation Timing Diagnostic Test in detecting canine plasma progesterone concentrations. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, 31: 57-64.

- McDonald LE, Pineda MH (1989): Endocrinología Veterinaria y Reproducción. Ed. Interamericana McGraw-Hill, México DF, pp: 448-473.
- Medrano A, Cabrera F, González F, Batista M, Gracia A (2002): Is sperm cryopreservation at – 150 °C a feasible alternative?. *Cryoletters*, 23: 167-172.
- Meryman HT (1971): Cryoprotectives agents. *Cryobiology*, 8: 173-183.
- Miles K (1995): Imaging pregnant dogs and cats. *Comp. Cont. Ed.*, 17: 1217-1226.
- Mora M (1996): El Libro del Presa Canario: Historia, Crianza, Manutención y Adiestramiento. Ed. Globo. La Laguna (Tenerife), pp: 15-64.
- Morton DB (1988): Artificial insemination with frozen semen in the dog: principles of "DNA fingerprinting". En: Reproductive Clinical Problems in the Dog (Jones D, Joshua J), Londres, pp: 169-186.
- Nöthling JO, Volkmann DH (1993): Effect of addition of autologous prostatic fluid on the fertility of frozen-thawed semen after intravaginal insemination. En: Fertility and Infertility Dogs, Cats and other Carnivores (Ed. Concannon PW, England GC, Verstegen JP, Russell HA), Cambridge, pp: 329-333.
- Nöthling JO, Gerstenberg C, Volkmann DH (1995): Success with intravaginal insemination of frozen-thawed dog semen: a retrospective study. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, 66: 49-55.
- Nöthling JO, Gerstenberg C, Volkmann DH (1997): Semen quality after thawing: correlation with fertility and fresh semen quality in dogs. *J. Reprod. Fertil. (Suppl.)*, 51: 109-116.
- Nöthling JO, Shuttleworth R (2005): The effect of straw size, freezing rate and thawing rate upon post-thaw quality of dog semen. *Theriogenology*, 63: 1469-1480.
- Nöthling JO, Shuttleworth, de Haas K, Thompson PN (2005): Homologous prostatic fluid added to frozen-thawed dog spermatozoa prior to intravaginal insemination of bitches resulted in better fertility than albumin-free TALP. *Theriogenology*, 64: 975-991.
- Núñez-Martínez I, Moran JM, Peña FJ (2005): Do computer-assisted, morphometric-derived sperm characteristics reflect DNA status in canine spermatozoa?. *Reprod. Dom. Anim.*, 40: 537-543.
- Oettlé EE (1982): Preliminary report: a pregnancy from frozen centrifuged dog semen. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, 53: 269-270.
- Oettlé EE, Soley JT (1986): Severe sperm abnormalities with subsequent recovery following on scrotal oedema and posthitis in a Bulldog. *J. Small Anim. Prac.*, 27: 477-484.
- Okkens AC, Kooistra HS, Dieleman SJ, Bevers MM (1997): Dopamine agonistic effects as opposed to prolactin concentrations in plasma as the influencing factor on the duration of anestrus in bitches. *J. Reprod. Fertil. (Suppl.)*, 51: 55-58.

Olar TT (1984): Cryopreservation of Dog Spermatozoa. *Ph.D. Dissertation. Colorado State University, Fort Collins, CO.* Cit en Peña A (1997): Supervivencia y Fertilidad del Semen Canino Sometido a Congelación-Descongelación. *Tesis Doctoral, Universidad de Santiago de Compostela.*

Olar TT, Bowen RA, Pickett BW (1989): Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures on post-thaw motility of canine spermatozoa frozen straws. *Theriogenology*, 31: 451-461.

Olson PN, Thrall MA, Nykes PM, Nett PM (1984): Vaginal cytology. Part I. A useful tool for staging the canine estrous cycle. *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.*, 6: 288-297.

Paramo RM, Renton JP, Ferguson JM, Concannon PW (1993): Effects of medroxyprogesterone acetate or gonadotrophin-releasing hormone agonist on suppression of spermatogenesis in the dog (*Canis Familiaris*). *J. Reprod. Fertil. (Suppl.)*, 47: 387-397.

Peña A (1997): Supervivencia y Fertilidad del Semen Canino Sometido a Congelación-Descongelación. *Tesis Doctoral, Universidad de Santiago de Compostela.*

Peña A, Quintela L, Herradón P (1998): Viability assessment of dog spermatozoa using flow cytometry. *Theriogenology*, 50: 1211-1220.

Peña A, Linde-Forsberg C (2000a): Effects of spermatozoal concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. *Theriogenology*, 54: 703-718.

Peña A, Linde-Forsberg C (2000b): Effects of Equex, one- or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology*, 54: 859-875.

Peña AI, Lugilde LL, Barrio M, Herradón PG, Quintela LA (2003): Effects of equex from different sources on post-thaw survival, longevity and intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration of dog spermatozoa. *Theriogenology*, 59: 1725-1739.

Peña AI (2004): Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Anim. Reprod. Sci.*, 82: 209-224.

Petrunkina AM, Simon K, Günzel-Apel AR, Töpfer-Petersen E (2003): Regulation of capacitation of canine spermatozoa during co-culture with heterologous oviductal epithelial cells. *Reprod. Dom. Anim.*, 38: 455-463.

Petrunkina AM, Radcke S, Günzel-Apel AR, Harrison RA, Töpfer-Petersen E (2004): Role of potassium channels, the sodium-potassium pump and the cytoskeleton in the control of dog sperm volume. *Theriogenology*, 61: 35-54.

Pinto CR, Paccamonti DL, Eilts BE (1999): Fertility in bitches artificially inseminated with extended, chilled semen. *Theriogenology*, 52: 609-616.

Post K (1985): Canine vaginal cytology during the estrous cycle. *Can. V. J.*, 26: 101-104.

- Renton JP, Boyd JS, Harvey MJ, Ferguson JM, Nickson DA, Eckersall P (1992): Comparison of endocrine changes and ultrasound as means of identifying ovulation in bitches. *Res. Vet. Sci.*, 53: 74-79.
- Rigau T, Farré M, Balleste J, Mogas T, Peña A, Rodríguez-Gil JE (2001): Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates. *Theriogenology*, 56: 801-815.
- Rijsselaere T, Van Soom A, Maes D, de Kruif A (2002): Effect of centrifugation on *in vitro* survival of fresh diluted canine spermatozoa. *Theriogenology*, 57: 1669-1681.
- Rijsselaere T, Van Soom A, Maes D, de Kruif A (2003): Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyzer. *Theriogenology*, 60: 1553-1568.
- Rijsselaere T, Van Soom A, Maes D, Verberckmoes S, de Kruif A (2004): Effect of blood admixture on *in vitro* survival of chilled and frozen-thawed canine spermatozoa. *Theriogenology*, 61: 1589-1602.
- Rijsselaere T, Van Soom A, Van Cruchten S, Coryn M, Gortz K, Maes D, de Kruif A (2005a): Effect of the timing of artificial insemination on the number of spermatozoa discovered in the uterine crypts of the bitch. *Reprod. Fertil. Dev.*, 17: 152 (*Proceedings of the Annual Conference of the International Embryo Transfer Society 2005*).
- Rijsselaere T, Van Soom A, Tanghe S, Coryn M, Maes D, de Kruif A (2005b): New techniques for the assessment of canine semen quality: a review. *Theriogenology*, 64: 706-719.
- Rodríguez-Gil JE, Montserrat A, Rigau T (1994): Effects of hypoosmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa. *Theriogenology*, 42: 815-829.
- Rohloff D, Laiblin C, Heidrich S (1978): Untersuchungen über die gefrierschutzwirkung von glicering und DMSO bei der tiegefrierung von rüdensperma. *Berl. Münch. Tieräztl-Wschr.*, 91: 31-33.
- Rota A, Ström B, Linde-Forsberg (1995): Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4° C. *Theriogenology*, 44: 885-900.
- Rota A, Iguer-ouada M, Verstegen J, Linde-Forsberg C (1999a): Fertility after vaginal or uterine deposition of dog semen frozen in a Tris extender with or without Equex STM Paste. *Theriogenology*, 51: 1045-1058.
- Rota A, Peña AI, Linde-Forsberg C, Rodríguez-Martínez H (1999b): *In vitro* capacitation of fresh, chilled and frozen-thawed dog spermatozoa assessed by the chlortetracycline assay and changes in motility patterns. *Anim. Reprod. Sci.*, 57: 199-215.
- Rota A, Mollo A, Marinelli L, Gabai G, Vincenti L (2003): Evaluation of cabergoline and buserelin and efficacy for oestrus induction in the bitch. *Reprod. Dom. Anim.*, 38: 440-443.
- Ruberte J, Sautet J (1998): Atlas de Anatomía del Perro y del Gato (3): Abdomen, Pelvis y Miembro Pelviano. Ed. *Multimédica*, Barcelona, pp: 112-119.

- Salamon S (1968): Deep-freezing of ram semen: recovery of spermatozoa after pelleting and comparison with other methods of freezing. *Aust. J. Biol. Sci.*, 21: 351-360.
- Sandoval J (2000): Tratado de Anatomía Veterinaria. Tomo III: Cabeza y Sistemas Viscerales. Ed. Facultad de Veterinaria-Universidad de León, León, pp: 359-387.
- Schäfer-Somi S, Ali Aksoy O, Patzl M, Findik M, Erünal-Maral N, Beceriklisoy HB, Polat B, Aslan S (2005): The activity of matrix metalloproteinase-2 and -9 in serum of pregnant and non-pregnant bitches. *Reprod. Dom. Anim.*, 40: 46-50.
- Schubert CL, Seager SW (1991): Semen collection and evaluation for the assessment of fertility parameters in the male Dalmatian. *Canine Pract.*, 16: 21: 30-34.
- Seager SW, Platz CC, Fletcher WS (1975): Conception rates and related data using frozen dog semen. *J. Reprod. Fertil.*, 45: 189-196.
- Seager SW, Platz CC (1977): Artificial insemination and frozen semen in the dog. *Vet. Clin. N. Am.*, 7: 757-764.
- Seager SW (1986): Semen collection and evaluation in the dog. En: Current Therapy in Theriogenology (Morrow DA). Ed. WB Saunders, Philadelphia, pp: 539-541.
- Silva LD, Verstegen JP (1995): Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology*, 44: 571-579.
- Silva LD, Onclin K, Lejeune B, Verstegen JP (1996): Comparisons of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen. *The Veterinary Record*, 138: 154-157.
- Simpson GM, England GC, Harvey MJ (2000): Manual de Reproducción y Neonatología en Pequeños Animales. Ediciones S, Barcelona, pp: 1-14; 79-90; 109-124; 125-138; 267-296.
- Singh MP, Sinha AK, Singh BK, Prasad RI (1996): Effect of cryoprotectants on release of various enzymes from buck spermatozoa during freezing. *Theriogenology*, 45: 405-416.
- Sokolowski JH, Zimbelman RG, Goyings LS (1973): Canine reproduction: reproductive organs and related structures in nonparous, parous and postpartum bitch. *Am. J. Vet. Res.*, 34: 1001-1013.
- Srikandakumar A, Ingraham EH, Ellsworth M, Archbald LF, Liao A, Godke RA (1986): Comparison of a solid-phase, no extraction radioimmunoassay for progesterone with an extraction assay for monitoring luteal function in the mare, bitch, and cow. *Theriogenology*, 26: 779-793
- Steinez BG, Goldsmith LT, Hasan SH, Lust G (1990): Diurnal variation of serum progesterone, but not relaxin, prolactin, or estradiol-17 beta in the pregnant bitch. *Endocrinology*, 127: 1057-1063.
- Tello CL, Reyes M, Bernal SA (1988): Some semen traits in German Sheperd dogs. *Avances en Ciencias Veterinarias*, 3: 52-56.



Threlfall W (2005): Recolección y evaluación del semen. En: Manual de Reproducción del Perro y del Gato (Root Kustritz MV). *Multimédica Ediciones Veterinarias*, Barcelona, pp: 43-54.

Thomas PG, Larsen RE, Burns JM, Hahn CN (1993): A comparison of three packaging techniques using two extenders for cryopreservation of canine semen. *Theriogenology*, 40: 1199-1205.

Thuróczy J, Wölfling A, Tibold A, Balogh L, Jánoki GA, Solti L (2003): Effect of anticoagulants and sampling time on results of progesterone determination in canine blood samples. *Reprod. Dom. Anim.*, 38: 386-389.

Tibary A, Memon M (2005): Gestación. En: Manual de Reproducción del Perro y del Gato (Root Kustritz MV). *Multimédica Ediciones Veterinarias*, Barcelona, pp: 93-106.

Toal RL, Walker MA, Henry GA (1986): A comparison of real-time ultrasound, palpation and radiography in pregnancy detection and litter size determination in the bitch. *Vet. Radiol.*, 27: 102-108.

Tsutsui T, Hase M, Tanaka A, Fujimura N, Hori T, Kawakami E (2000): Intrauterine and intravaginal inseminations with frozen canine semen using an extender consisting of orvus paste-supplemented egg yolk tris-fructose citrate. *J. Vet. Med. Sci.*, 62: 603-606.

Vannucchi CI, Mirandola RM, Oliveira CM (2002): Acute-phase protein profile during gestation and diestrus: proposal for an early pregnancy test in bitches. *Anim. Reprod. Sci.*, 74: 87-99.

Vázquez JM, Ramírez G, Gil F, Latorre R, Moreno F, López O, Orenes M, Arencibia A (2000): Atlas de Anatomía Clínica del Perro y Gato: Cavidades Torácica, Abdominal y Pelviana. Ed. *Novograf SA*, Murcia, pp: 119-122.

Verstegen JP, Onclin K, Silva LD, Concannon PW (1999): Effect of stage of anestrus on the induction of estrus by the dopamine agonist cabergoline in dogs. *Theriogenology*, 51: 597-611.

Verstegen JP, Iguer-ouada M, Onclin K (2002): Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 57: 149-179.

Verstegen JP, Iguer-ouada M (2005): Oestrous cycle stage dependent effects of male and female blood plasma and vaginal fluid on dog semen motility parameters. *Theriogenology*, 64: 810 (*Proceedings of the 2005 Annual Conference of the Society for Theriogenology*).

Verstegen JP, Onclin K, Iguer-ouada M (2005a): Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris-glucose extender: *in vitro* and *in vivo* studies. *Theriogenology*, 64: 720-733.

Verstegen JP, Iguer-ouada M, Luz M, Onclin K (2005b): Dog semen freezing after 1, 2 or 3 days chilling. *Theriogenology*, 64: 815 (*Proceedings of the 2005 Annual Conference of the Society for Theriogenology*).

Wallace SS, Mahaffey S, Miller DM, Thompson FN, Chakraborty PK (1992): Ultrasonographic appearance of the ovaries of dogs during the follicular and luteal phases of the estrous cycle. *Am. J. Vet. Res.*, 53: 209-215.

Watts JR, Wright PJ, Parry BW (2001): Sodium cloprostenol administered at a continuous low dosage induces polydipsia and suppresses luteal function in early dioestrous bitches. *Anim. Reprod. Sci.*, 67: 113-123.

Watson PF (1990): Artificial insemination and preservation of semen. En: Marshall's Physiology of Reproduction. 2: Reproduction in the Male (Lamming GE). Ed Churchill Livingstone, Edimburgo, pp: 747-869.

Watson PF (1995): Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.*, 7: 871-891.

Weilenmann R, Arnold S, Dobeli M, Rusch P, Zerobin K (1993): Estrus induction in bitches by the administration of PMSG and HCG. *Schweiz. Arch. Tierheilkd*, 135: 236-241.

Wilson MS (1993): Non surgical intra-uterine insemination in bitches using frozen semen. *J. Reprod. Fertil. (Suppl.)*, 47: 307-311.

Wilson MS (2001): Transcervical insemination techniques in the bitch. *Vet. Clin. North Am.*, 31: 291-304.

Yeager AE, Mohammed HO, Meyers-Wallen V, Vannerson L, Concannon PE (1992): Ultrasonographic appearance of the uterus, placenta, fetus, and fetal membranes throughout accurately timed pregnancy in beagles. *Am. J. Vet. Res.*, 53: 342-351.

Yildiz C, Kaya A, Aksoy M, Tekeli T (2000): Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology*, 54: 579-585.

Zoldag L, Fekete S, Csaky I, Bersenyi A (2001): Fertile estrus induced in bitches by bromocryptine, a dopamine agonist: a clinical trial. *Theriogenology*, 55: 1657-1666.