

AVANCES EN INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN CANINOS

Advance on artificial insemination in canine

María Alejandra Stornelli*

- Cátedra y Servicio de Reproducción Animal; Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.

* Corresponding author:
María Alejandra Stornelli
Address:
Calle 60 y 118, La Plata,
Argentina.
Tel+54-2214236663/4,
ext 455; fax +54-
2214257980

E-mail:
astornel@fcv.unlp.edu.ar

ABSTRACT

Artificial insemination in dogs is a technique with great potential in clinical reproduction. This biotechnology can be implemented with moderate or high complexity and with low or medium cost depending the technique and the type of semen used (fresh, chilled, frozen). In any case it can produce great benefits to canine reproduction. If good semen quality is obtained, and it is properly handled and artificial insemination is done at the right time, pregnancy rate could be very encouraging. Although, if those factors are not properly controlled the results obtained could be very discouraging.

Keywords: artificial insemination, semen, laparoscopy, canine

RESUMEN

La Inseminación Artificial (IA) en caninos es una práctica que brinda grandes beneficios en la clínica reproductiva diaria. Esta biotecnología puede ser de moderada o alta complejidad, de bajo o mediano costo, según la técnica y el tipo de semen (fresco, refrigerado o congelado) utilizado. En cada caso brinda diferentes posibilidades, otorgando siempre grandes beneficios en la reproducción canina. Si se extrae semen de buena calidad, se lo acondiciona y maneja adecuadamente, se realiza la IA en el momento oportuno y se aplica la técnica adecuada, se pueden obtener porcentajes de fertilidad muy alentadores. Aunque, si los factores mencionados no son adecuadamente controlados puede tornarse una práctica desalentadora.

Palabras clave: Inseminación artificial, semen, laparoscopia, canino

INTRODUCCION

Desde que Lazzaro Spallanzani en 1787 realizó la primera Inseminación Artificial (IA) con semen fresco en caninos, este procedimiento ha sido aplicado y desarrollado a través del tiempo en la reproducción de pequeños animales (Stornelli 2004; Jewgenow, 2012). Ya en 1776 Spallanzani había observado que las bajas temperaturas provocaban una reducción reversible de la actividad metabólica de los espermatozoides, lo cual permitía almacenarlos (Spallanzani, 1776). Fue en 1956 que Harrop logra la *primera preñez* con semen refrigerado (Harrop, 1960) abriendo las puertas a la criopreservación. Posteriormente, en 1969, se comunica por primera vez una IA satisfactoria con semen congelado (Seager, 1969). La IA en caninos ha recorrido un largo camino llegando hoy a poder realizar IA a bajas dosis con semen sexado (Wei, 2017).

Con el avance de la biotecnología, cada vez es más frecuente el uso de IA tanto para realizarla con semen fresco como con

semen criopreservado. El estado de salud y nutrición de los reproductores, así como el manejo del momento de inseminación, semen utilizado y técnica de inseminación determinarán el éxito o fracaso de la IA. La misma permite la interacción de dos reproductores cuando no se puede llevar a cabo el servicio natural, optimizar el uso de semen de buena calidad (inseminando a 2 o más perras con un mismo eyaculado), utilizar semen sexado y utilizar semen criopreservado. La IA con semen refrigerado o congelado permite trabajar con dos reproductores en localizaciones geográficas distantes, sin necesidad de transportarlos, lo cual brinda grandes ventajas para los criadores. Así mismo la congelación de semen en caninos se encuentra en constante estudio y desarrollo debido al creciente interés de criadores y teriogenólogos. Este método de criopreservación hace posible el uso de reproductores mucho después de finalizado su período útil como semental y la conservación del material genético del macho siendo esto último de gran importancia en cánidos silvestres en peligro de extinción. Por otro lado, el semen sexado hace posible la obtención de cachorros machos

o hembras según la necesidad de reproductores o mascotas en relación con su uso o a la preferencia de un sexo en relación con la raza.

Como hemos mencionado varias son las indicaciones para realizar IA en el perro, sin embargo, deben considerarse algunas cuestiones éticas en relación con los diferentes intereses de grupos específicos (criadores, propietarios y veterinarios). Es una técnica valiosa cuando anomalías físicas y/o de comportamiento en machos y hembras impiden el apareamiento natural sin olvidar que nunca debe lograrse descendencia mediante IA en animales con afecciones transmisibles a la descendencia.

Éxito o fracaso de la inseminación artificial

La IA es una técnica útil, de baja o mediana complejidad, de moderado costo, que brinda grandes posibilidades en la clínica reproductiva diaria y el desarrollo biotecnológico. Sin embargo, si no se tienen en cuenta algunos factores sumamente importantes en su aplicación, puede tornarse una práctica desalentadora.

El éxito de la IA en caninos está íntimamente relacionado con:

- Estado de salud y nutrición de los reproductores.
- Detección del momento de mayor fertilidad de la hembra.
- Tipo, manejo y calidad del semen utilizado.
- Implementación de una técnica adecuada de IA.

Si se cumplen con estos requisitos, la probabilidad de éxito será alta mientras que, en caso contrario, será una experiencia frustrante.

Estado de salud y nutrición de los reproductores

La reproducción es una función altamente especializada y es preciso lograr el exacto equilibrio entre la sanidad y la nutrición para que el animal pueda expresar completamente su capacidad reproductiva. La aplicación de IA en animales sanos, fértiles y adecuadamente alimentados hará posible aumentar las posibilidades de éxito, no solo en lograr una preñez, sino también una camada de alto número de cachorros. Utilizar IA en una hembra con alguna afección orgánica o un inadecuado aporte nutricional que comprometa su fertilidad, sólo significará un mal aprovechamiento de recursos y tecnología.

Detección del momento de mayor fertilidad de la hembra

La IA debe ser realizada en el momento adecuado para que los espermatozoides puedan interrelacionar con óvulos maduros capaces de ser fecundados, de otro modo no será un procedimiento exitoso. Este factor es crítico cuando se trabaja con semen criopreservado.

En los caninos la duración del proestro es variable, pudiendo oscilar entre 2 y 25 días. La ovulación ocurre aproximadamente 48 horas luego de ocurrido el pico preovulatorio de hormona luteinizante (LH), al inicio del estro. El oocito es ovulado al comienzo de la primera división meiótica, la maduración se completa en el oviducto y requiere aproximadamente 2 días (Fastard, 2000). Las particularidades fisiológicas de los caninos dificultan la estimación del momento de mayor fertilidad de la hembra sin el uso de métodos complementarios. Debido a la elevación de

la estrogenemia en el proestro, el número de capas celulares del epitelio vaginal aumenta. Este hecho hace que las células lumbales se alejen de la irrigación sanguínea evolucionando hacia la muerte. Este fenómeno podrá visualizarse claramente en los extendidos vaginales en los cuales aumentará el porcentaje de células superficiales a medida que se acerca el fin del proestro y el comienzo del estro (Jhonston et al., 2001). El estudio de extendidos vaginales seriados desde el comienzo del proestro nos permitirá, junto con la imagen vaginoscópica, aproximar el comienzo del estro (Lindsay et al., 1988; Fosberg, 1994; Steckler, 2013). Aun así, no podemos identificar exactamente el momento de mayor fertilidad de la hembra. El dosaje de progesterona sérica hará posible determinar el momento de la ovulación a través de la estimación indirecta del pico de LH. La progesterona asciende de niveles basales (0,5 ng/ml) a niveles superiores (≥ 2 ng/ml) cuando ocurre el pico preovulatorio de LH. El dosaje sérico Steckler o de LH es el método más exacto para identificar el pico de LH. Sin embargo, debido al costo, este método no se utiliza rutinariamente (Concannon et al., 1975).

Si estimamos el día en que ocurre el pico preovulatorio de LH, dos días más tarde ocurrirá la ovulación de ovocitos primarios, los cuales madurarán en aproximadamente 48 horas (Concannon et al., 1975; Concannon et al., 1977; Concannon, 1997; Steckler 2013). Los óvulos permanecerán capaces de ser fecundados por 4 o 5 días, momento en el cual realizaremos la IA. Si trabajamos con semen congelado el momento indicado para realizar la IA será entre 72 y 96 horas luego de la ovulación (Fosberg y Fosberg, 1989, Steckler; 2013).

Si bien en la mayoría de las hembras la ultrasonografía permite determinar la ovulación, en la perra la grasa acumulada en la bolsa ovárica dificulta la mencionada evaluación. Algunos estudios han mostrado que las imágenes de ultrasonido de los ovarios cerca de la ovulación son más difíciles de analizar, debido a que los folículos ováricos no difieren mucho entre el periodo pre y post-ovulatorio (England y Concannon, 2002). Esto se debe a que no todos los folículos del perro se colapsan en la ovulación (Yeager y Concannon, 1996) y también porque los folículos no ovulados con frecuencia permanecen en el ovario (Wallace et al., 1992). En un estudio más reciente Fontbonne pudo estimar con exactitud la ocurrencia de ovulación mediante ultrasonografía. En el mencionado estudio las estructuras ováricas observadas mediante ultrasonografía fueron comparables con las observaciones macroscópicas realizadas en los ovarios. Debe considerarse que el autor el autor expresa que la observación ultrasonográfica puede ser dificultosa en razas grandes o en animales obesos. Por el momento, en los caninos la evaluación de la dinámica folicular a través de la ecografía sigue siendo experimental.

Tipo, manejo y calidad del semen utilizado

El conocimiento de la calidad de semen de un reproductor nos permitirá estimar las probabilidades de éxito en la utilización del mismo para realizar IA con semen fresco o criopreservado. En el perro la información disponible sobre la relación entre calidad del semen y fertilidad es escasa comparada con otras especies. Se ha estimado que la cantidad mínima de espermatozoides necesarios para preñar una hembra es de 150 a 200 x 10⁶ (Morrow, 1980; Kirk, 1989; Dumond y Fontbonne, 1993). Sin embargo, se han comunicado preñeces con 20 x 10⁶ espermatozoides depositando quirúrgicamente semen fresco en la porción proximal del cuerno uterino y dos dosis de 30-35 x 10⁶ de espermatozoides realizando IA

intrauterina por medio de cateterización cervical con endoscopio (Tsutsui et al., 1989; Wilson, 1993).

La significación de las alteraciones morfológicas de los espermatozoides es otro parámetro muy poco estudiado. Algunos autores han comunicado que los defectos espermáticos primarios y secundarios no deben exceder el 30 o 40 % (Feldman y Nelson, 1987; Oettle, 1993). Si bien la relación entre el tipo de defecto y fertilidad no ha sido establecida, se ha observado pérdida de la capacidad fecundante asociada con la presencia de gota citoplasmática proximal. Por el contrario, la presencia de gota citoplasmática distal no se ha relacionado con pérdida de fertilidad seminal. Ambos defectos disminuyen la resistencia espermática al congelado, por lo cual deben considerarse a la hora de realizar criopreservación de semen (Morton y Bruce, 1989). La motilidad es una variable de gran importancia en la calidad seminal. Se estima que un semen de buena calidad debe poseer no menos del 70 % de espermatozoides con motilidad progresiva (Johnston, 1991).

En el semen congelado la motilidad espermática luego del descongelado es el mejor indicador de fertilidad (Morton y Bruce, 1989). La adición de Royal Jelly a diluyentes con Equex STM paste ha mostrado tener efectos sinérgicos en la viabilidad espermática al descongelado (Kong et al., 2001). Se han encontrado efectos benéficos en la adición de Orvus ES paste al diluyente, tanto en la protección acrosómica como en el porcentaje de espermatozoides móviles al descongelado (Tsutsui et al., 2000). El semen de baja calidad se relaciona no sólo con bajas tasas de preñez sino también con producción de camadas de escaso número de cachorros (Fosberg CL y Fosberg M, 1989; England y Allen, 1989; Fosberg, 1991).

En la actualidad la IA se realiza con semen fresco, refrigerado o congelado, cada tipo de semen nos brindará distintas posibilidades de aplicación, así como también exigirá un manejo de diferente complejidad. En Sudamérica la IA con semen fresco se realiza ocasionalmente, aunque, su uso ha ido en aumento en la última década en relación con el desarrollo de la clínica reproductiva en caninos y al aumento de reproductores de razas en las cuales el servicio natural se dificulta. La IA con semen refrigerado y/o congelado, si bien es de uso rutinario en Europa y Estados Unidos, es aún utilizada en forma poco frecuente en Sudamérica. Considerando la baja complejidad necesaria para la realización de esta técnica con semen fresco o refrigerado y las posibilidades que brinda, en poco tiempo será utilizada frecuentemente si se difunde adecuadamente su técnica de realización, manejo y aplicaciones.

La IA con semen congelado requiere un mayor desarrollo de la metodología de congelación. Sin embargo, el trabajo realizado en el área indica que, en un futuro cercano en América del sur, estará disponible la posibilidad de acceder a bancos de semen congelado más fácilmente.

Inseminación artificial con semen fresco

La IA con semen fresco es una práctica sencilla y poco costosa que puede implementarse sin inconvenientes en la clínica reproductiva diaria. La utilización de IA con semen fresco brindará resultados comparables (tasas de preñez y tamaño de la camada) con los obtenidos mediante servicio natural (Fosberg y Fosberg, 1989; England y Allen, 1989; Fosberg, 1991; Fosberg, 1996). En un estudio realizado con 422 hembras, luego del servicio natural, realizado en el momento de mayor fertilidad, se obtuvo una tasa de preñez del 84.4 % (England y Allen, 1989). Por otra parte, implementando IA con semen fresco se obtuvo un porcentaje de preñez de 83,8 %

(Morton y Bruce, 1989). La obtención de semen se realiza rutinariamente por masturbación, aunque puede utilizarse electro eyaculación en animales muy agresivos o en los que no logran eyacular por la técnica manual. La recolección de la fracción espermática es suficiente para realizar la IA, parte de la fracción prostática puede recolectarse sólo para asegurarse que se ha recolectado toda la segunda fracción. Si el volumen de la fracción espermática es escaso, la fracción prostática puede servir para aumentarlo y facilitar el manejo del semen. Una vez colectado en un recipiente adecuado, el semen es aspirado con una jeringa y depositado inmediatamente luego de la extracción en la vagina craneal, mediante una sonda de longitud variable según el tamaño de la hembra (Figura 1; Ettinger y Feldman, 1995). Es muy importante asegurarse que se ha obtenido un eyaculado de buena calidad mediante la evaluación de la concentración y motilidad espermática a través de la observación rápida de una alícuota de semen separada con este fin. Todo el material utilizado para la recolección, así como el usado para la IA debe ser estéril y libre de sustancias químicas contaminantes que puedan afectar la calidad del eyaculado. También es necesario que el material se encuentre a 37 °C para evitar el shock térmico de los espermatozoides (Johnston, 1991). Mediante IA con semen fresco se podrá obtener descendencia cuando no es posible realizar servicio natural por diferentes causas pudiendo ser aprovechados estos animales como reproductores. Esta práctica no debe ser llevada a cabo cuando la imposibilidad del servicio se relacione con problemas de transmisión hereditaria como por ejemplo displasia de cadera.



Figura 1: Inseminación intravaginal en canino

Inseminación artificial con semen refrigerado

Mediante el agregado de diluyentes, el semen puede ser refrigerado y de esta manera conservado y transportado. Las bajas temperaturas disminuyen las tasas metabólicas del espermatozoide y prolongan su longevidad (Watson, 1995). Los diluyentes protegen a las membranas del espermatozoide del daño causado por los cambios de temperatura, proveen energía y mantienen estables el pH y la osmolalidad (Lardy y Philips, 1939; Marshall y Hugh, 1990). Los antibióticos agregados a los diluyentes evitan la proliferación bacteriana, en especial en los que contienen yema de huevo (Rota et al., 1995).

Para la conservación de semen a 4 °C han sido usados diferentes diluyentes. Dentro de los más utilizados se encuentra el tris-buffer con el agregado de 20 % de yema de huevo

(TYH) y diluyentes compuestos por yema de huevo y crema o leche descremada (Morrow, 1980; Kirk, 1989). Algunas experiencias realizadas *in vitro* encuentran mejor conservación del semen en TYH (Rota et al., 1995; Stornelli et al., 2001). Con la utilización de tris-buffer con el agregado de 20 % de yema de huevo como diluyente se han obtenido tasas de preñez de 62,5 % (Fosberg, 1991). Se han logrado buenos resultados *in vitro* almacenando y conservando semen canino diluido en MR-A® (Kubus SA, España) -yema de huevo a 4 y 15 °C (Stornelli et al., 2001; Savignone et al., 2001). Las mejores tasas de preñez obtenidas utilizando semen refrigerado se lograron con diluyentes realizados con tris/yema de huevo (62,5 %) y yema de huevo/crema (51,1 %) (Fosberg, 1996).

Para la refrigeración se colecta la fracción espermática del semen y se la mezcla con el diluyente elegido, el cual debe encontrarse a la temperatura del semen en el momento de la dilución. Entre semen y diluyente debe respetarse una relación 1:3 o 1:4, una proporción excesiva de diluyente tendrá influencias negativas sobre la motilidad. El semen así preparado puede refrigerarse a 4 °C y utilizarse para IA lográndose tasas de preñez aceptables durante las primeras 24-48 h. Previo a la IA el semen refrigerado debe alcanzar lentamente la temperatura ambiente (Dumond y Fontbonne, 1993; Fosberg, 1996). La utilización de semen refrigerado con diluyentes protectores como el tris-buffer con el agregado de 20 % de yema de huevo permite conservar espermatozoides con buena capacidad fecundante por un período de tiempo suficiente para trasladar el semen e inseminar animales ubicados en localizaciones geográficas distantes. Esto hace posible la IA de una hembra con el semen de un macho que se encuentre en otra provincia u otro país limítrofe o cercano con mínimo gasto y baja complejidad de manejo. De esta manera se amplían las posibilidades de uso de un reproductor, permitiendo la comercialización de semen y facilitando el intercambio genético entre diferentes establecimientos. La simplicidad de manejo del semen refrigerado y su bajo costo, lo convierten en una excelente opción para nuestro país.

Inseminación artificial con semen congelado

La congelación de semen canino es un procedimiento que no puede realizarse en la práctica veterinaria diaria ya que requiere equipos especiales y personal especializado en el

área (Morrow, 1980; Kirk, 1989; Morton y Bruce, 1989; England, 1993; Smith, 1986). El uso de semen congelado puede implementarse respetando algunas normas básicas manejo y descongelado del mismo. Mediante la congelación es posible el uso del semen de un macho cuando este ya no puede ser usado como reproductor, inseminar una hembra que se encuentre en una localización geográfica distante y almacenar semen en épocas en las cuales el reproductor no sea requerido para servicios. Así mismo un banco de semen puede constituir un importante reservorio genético para la cinofilia y la conservación de razas en las que la población pueda disminuir drásticamente en el futuro.

El semen canino puede congelarse en pastillas o pajuelas de 0,5 o 0,25 ml. Las pastillas, difíciles de identificar, se usan ocasionalmente a diferencia de las pajuelas que son preferidas por su más fácil identificación y mejor manejo en el descongelado (Fosberg y Fosberg, 1989; Nothling y Volkman, 1997; Dobrinski et al., 1993; Hori et al., 2011). Controles periódicos del termo de almacenamiento que aseguren un volumen de nitrógeno que permita una buena conservación del semen y una reducida exposición del mismo a temperatura ambiente fuera del nitrógeno durante el manejo de pajuelas o pastillas permitirá conservarlo en buenas condiciones para su posterior uso. Cada tipo de almacenamiento (pastillas, pajuelas) requiere diferentes condiciones de descongelado. Las pastillas se descongelan a 37 °C utilizando usualmente solución salina de cloruro o citrato de sodio como diluyente. Las pajuelas de 0,5 ml se descongelan en baño térmico a 37 °C durante 1 minuto o a 75 °C durante 6 segundos, mientras que las minipajuelas (0,25 ml) deben descongelarse a 75°C durante 5 segundos (Kirk, 1989; Smith, 1986). La mayoría de los autores logran mejores resultados utilizando inseminación intrauterina (mediante laparotomía, laparoscopia o cateterismo cervical) para el uso de semen congelado (Fosberg, 1991; Silva et al., 1996). Los porcentajes de preñez obtenidos con el uso de inseminación intrauterina varían entre 60% y 90 % (Dumond y Fontbonne, 1993; Wilson, 1993; Nothling y Volkman, 1997; Silva et al., 1996; Fosberg et al., 1999). Los resultados obtenidos por los diferentes autores son muy variables, esto puede explicarse por la variabilidad existente entre diluyentes, envasado y metodología de congelación y descongelación utilizadas (Tabla 1).

Tabla 1: Porcentajes de preñez en la perra obtenidos realizando IA con semen congelado

Autor	Técnica de IA	Diluyente utilizado	Hembras inseminadas	Porcentaje de preñez	Tamaño de camada
Silva et al., (1996)	Intrauterina, Laparoscópica	Diluyente (Laiciphos 478, IMV)	5	60%	nd
Fosberg et al., (1999)	Intrauterina, Laparoscópica	Diluyente (CLONE)	19	58%	6 ± 2
Fosberg et al., (1999)	Intrauterina, catéter noruego	Diluyente (CLONE)	167	84%	5,4 ± 3
Fosberg et al., (1999)	Vaginal	Diluyente (CLONE)	141	59%	4 ± 2,7
Nothling et al., (1993)	Vaginal	Triladyl	10	60%	2,4 ± 2,8
Fastard (1984)	Intrauterina, catéter noruego	Tris base	30	67%	5,5
Andersen (1972)	Vaginal,	Tris base	8	0%	nd
Andersen (1972)	Intrauterina, quirúrgica	Tris base	1	100%	3
Rota (1998)	Intrauterina, Transcervical endoscópica	Tris base con 0,5% de Equex STM paste	5	100%	2,2 ± 2,0

Por otra parte, la técnica de inseminación intrauterina utilizada varía con la disponibilidad de material, equipos y entrenamiento de cada especialista (Fosberg, 1991; Silva et al., 1996; Fosberg et al., 1999). Nothling informa buenos resultados (87,5 % de preñez) con el uso de IA intravaginal mediante el agregado de fracción prostática al semen luego del descongelado (Nothling y Volkman, 1993). Hasta el momento, esta experiencia no ha sido reproducida por otros autores con éxito. El tamaño de camada promedio alcanza valores entre 2,8 y 5,4 utilizando IA transcervical (Fosberg et al., 1999; Günzel-Apel, 1999; Szász et al., 2000) 4,8 mediante la aplicación de IA intrauterina quirúrgica (Günzel-Apel, 1999) y 4,6 IA vaginal (Nötling et al., 1995). Los resultados obtenidos en IA con semen congelado (porcentaje de preñez y tamaño de camada) son inferiores a los obtenidos en IA con semen fresco, sin embargo, son lo suficientemente buenos, como para estimular su uso en especial cuando un reproductor es realmente valioso. El uso de semen con bajo porcentaje de espermatozoides viables al descongelado y las fallas en la determinación del momento de mayor fertilidad son dos factores críticos cuando se trabaja con semen congelado (Watson, 2000; Salamon y Maxwell, 2000; Fastard, 1984; Fastard y Andersen-Berg, 1989). El proceso de congelación – descongelación resulta en una reducida fertilidad comparada con la del semen fresco. Se ha comprobado que esto resulta de una combinación tanto de pérdida de viabilidad como de daño de la población espermática sobreviviente. Se estima que entre el 40 y 50% de la población de espermatozoides no sobrevive al proceso de congelación - descongelación. Por otro lado, parte de la población de espermatozoides que sobreviven habrán sufrido daños que los convierten en incapaces de fecundar (Watson, 2000). Por lo tanto, la IA debe ser realizada con un número de espermatozoides vivos y competentes al descongelado, suficientes para obtener una alta probabilidad de fertilización. Es por esto que debe considerarse un protocolo de criopreservación que no sólo logre una gran población de sobrevivientes sino también la integridad de las células que la conforman (Tsutsui et al., 1989). En el perro se estima que 200×10^6 espermatozoides viables al descongelado son necesarios para obtener tasas aceptables de preñez (Jhonston et al., 2001).

En la clínica reproductiva, el semen congelado es usado frecuentemente en Estados Unidos, ocasionalmente en Europa y muy raramente en Sud América; sin embargo, la aplicación de esta biotecnología se encuentra en amplio desarrollo. La congelación de semen canino aplicando metodologías que permitan obtener porcentajes aceptables de espermatozoides viables al descongelado hará posible introducir esta biotecnología en nuestro medio. Si bien el proceso de congelación de semen canino requiere un moderado costo, equipamiento, infraestructura y entrenamiento del operador, su utilización mediante IA puede ser aplicada en la práctica diaria mediante el uso de técnicas de IA intrauterinas sencillas (IA quirúrgica) que no requieren más entrenamiento que el necesario para realizar una ovariectomía, práctica de rutina en el ejercicio profesional diario.

Técnicas de inseminación

En el servicio natural el macho realiza la eyaculación dentro de la vagina de la hembra. En la IA el depósito del esperma en el tracto genital femenino puede realizarse dentro de la vagina o dentro del cuerpo del útero dependiendo de la calidad del semen y del uso de semen fresco, refrigerado o congelado. Cuanto más alto en el tracto genital femenino sea

realizada la inseminación, menos espermatozoides necesitaremos para lograr la fertilización (Salamon y Maxwell, 2000). Esto fue demostrado claramente en los ovinos, especie en la cual la IA intrauterina requiere una dosis inseminante 10 veces menor que la cervical posterior (Watson, 2000). Cuando se trabaja con semen fresco se utiliza IA intravaginal, reservando la vía intrauterina cuando se trabaja con semen hipospérmico. La IA intravaginal es una técnica sencilla que se aplica también con semen refrigerado. Cuando se trabaja con semen congelado la IA es usualmente intrauterina (Wilson, 1993; Fosberg, 1991; Silva et al., 1996), aunque algunos autores obtienen buenos resultados con IA intravaginal (Nothling y Volkman, 1997).

Inseminación artificial intravaginal

En la IA intravaginal el semen será depositado en la vagina craneal la hembra mediante un catéter de longitud acorde al tamaño del animal. La vagina de la hembra canina es de una longitud apreciable (10 a 12 cm en una Beagle de 10 kg de peso), y varía enormemente con la raza considerada. Es así que el tamaño de los catéteres también tendrá gran variación. El catéter se introducirá a través de los labios vulvares, evitando la fosa del clítoris, dirigiéndose primero hacia dorsal para luego dirigirse hacia craneal adecuándose a la anatomía de la hembra canina. Una vez que el catéter se encuentra en el fondo de la vagina, el semen es impulsado a través de él mediante una jeringa y depositado en vagina craneal (Figura 1 y 2). Luego el catéter es retirado y la hembra es mantenida 10 a 15 minutos con el tren posterior sobreelevado (Ettinger y Feldman, 1995).



Figura 2: Inseminación intravaginal con semen refrigerado

La totalidad del material utilizado deberá estar estéril, libre de sustancias que alteren la viabilidad espermática y precalentado a 37 °C para evitar alterar la calidad del eyaculado (Marshall y Hugh, 1990).

Inseminación artificial intrauterina

La inseminación artificial intrauterina puede realizarse depositando el semen en el útero, a través de la cateterización de cérvix o inoculándolo directamente en el cuerpo o cuernos

uterinos en forma quirúrgica. La elección de la técnica dependerá de la calidad y tipo de semen utilizado, como se trató anteriormente, y de los equipos disponibles.

Inseminación artificial intrauterina transcervical

La IA intrauterina puede realizarse mediante la cateterización del cuello uterino con catéteres de 20 a 50 cm de longitud y 0,5 mm de diámetro, con la punta protegida por una cubierta de nylon (catéter Noruego; Figura 3). Con la hembra en estación, el operador fija el cérvix entre sus dedos a través de la pared abdominal, con la otra mano introduce el catéter hasta la región del cuello, retira la cubierta de nylon y penetra el cuello uterino para depositar el semen en el cuerpo del útero. No es necesario sedar al animal, pero el operador necesita entrenamiento previo para realizar correctamente la técnica (Fosberg, 1991). La cateterización del cuello puede realizarse visualizando el cérvix con ayuda de un endoscopio (Wilson, 1993; Hayashi, 2013; Romagnoli, 2014). Este método permite al operador visualizar el cuello facilitando la maniobra de cateterización uterina. La hembra no necesita sedación, el operador requiere cierto entrenamiento y el equipamiento posee un costo considerable.



Figura 3: Caterer Noruego, pequeño, mediano y grande.

Inseminación artificial intrauterina quirúrgica

Puede realizarse mediante laparotomía, con anestesia general o epidural. Se deposita lentamente el semen en el cuerpo o cuernos uterinos mediante una jeringa y una aguja calibre 21, con el bisel hacia arriba y una inclinación de 45°C (Figura 4). Es una práctica sencilla pero el número de inseminaciones es limitado y deben extremarse las medidas para evitar infecciones (Dumond y Fontbonne, 1993; Held, 1997). También puede realizarse mediante laparoscopia, técnica utilizada rutinariamente en ginecología humana. Sin embargo, el costo de los equipos hace que esta técnica haya sido utilizada sólo ocasionalmente (Wildt, 1986).

CONCLUSIONES

Si bien la IA con semen fresco es una práctica usada rutinariamente en la reproducción de pequeños animales, no ocurre lo mismo con la IA con semen criopreservado (refrigerado o congelado). Sin embargo, el continuo estudio de los factores que posibilitan una mejor criopreservación de semen relacionados con los procesos de refrigerado, congelado y descongelado, posibilitarán en el futuro la aplicación frecuente de esa biotecnología.

La utilización de diluyentes que permitan conservar el semen canino a 4 °C, logrando altos porcentajes de espermatozoides vivos con motilidad progresiva e integridad acrosómica durante 2 a 5 días, hará posible el traslado de semen a diferentes puntos de nuestro país e incluso a países limítrofes o cercanos. Esto evitará el traslado de animales para la realización de servicio natural, disminuyendo los costos y esfuerzo que esto implica. Es importante destacar que el proceso de refrigeración de semen canino es de bajo costo y fácil realización, pudiendo implementarse con mínimo equipamiento y moderado entrenamiento del operador. Por otro lado, el semen refrigerado puede utilizarse realizando IA intravaginal, técnica poco costosa y de baja complejidad. La implementación de técnicas de refrigeración de semen e inseminación artificial con semen refrigerado en nuestro país permitirá a los médicos veterinarios de práctica privada brindar un nuevo servicio, aumentar sus ingresos y mejorar su práctica diaria. Procesos adecuados de dilución, elección correcta del buffer y crioprotectores, tiempo suficiente de equilibrio, curvas apropiadas de congelado y descongelado, determinarán un porcentaje reducido de células con membrana espermática dañada y una mayor sobrevida de los espermatozoides en el tracto genital femenino. La conservación de la integridad estructural y de la fisiología espermática forman parte de los factores que permiten altos porcentajes de preñez y tamaño de camada mayores. Con el desarrollo de la criopreservación de semen junto con la determinación exacta del momento de mayor fertilidad de la hembra y una adecuada técnica de IA, esta biotecnología brindará grandes posibilidades en el futuro. Por otra parte, la congelación de semen canino aplicando metodologías que permitan obtener porcentajes aceptables de espermatozoides viables al descongelado hará posible introducir esta biotecnología en nuestro medio. Si bien el proceso de congelación de semen canino requiere un moderado costo, equipamiento, infraestructura y entrenamiento del operador, su utilización mediante IA puede ser aplicada en la práctica diaria mediante el uso de técnicas de IA intrauterinas sencillas (IA quirúrgica) que no requieren más entrenamiento que el necesario para realizar una ovariectomía, práctica de rutina en el ejercicio profesional.



Figura 4: Inseminación intrauterina quirúrgica

REFERENCIAS

- Concannon PW, Hansen W, Visek WJ. The ovarian cycle of the bitch: plasma estrogen, LH and progesterone. *Biol. Reprod.* 1975. 13:112-121.
- Concannon PW, Hansen W, McEntee K. Changes in LH, progesterone and sexual behavior associated with preovulatory luteinization in the bitch. *Biol Reprod.* 1977. 17: 604-613.
- Concannon PW. A review for breeding management and artificial insemination with chilled or frozen semen. *Proceedings of canine reproduction Symposium. American college of theriogenologist.* 1997. 1-17.
- Dobrinski I, Lulai C, Barth AD, Post K. Effects of four extenders and three different freezing rates on postthaw viability of dog semen. *J Reprod Fertil.* 1993. 47: 291-296.
- Dumond C, Fontbonne A. *Les indispensables de l' animal de compagnie . Paris (Francia): P.M.C.A.C.* 1993. 153-159.
- England GCW, Allen WE. Seminal characteristics and fertility in dogs. *Vet Rec.* 1989.125: 399.
- England GCW. Criopreservation of dog semen: A review. *J Reprod Fertil.* 1993. 47: 243-255.
- Ettinger SJ, Feldman ER. *Textbook of Veterinary Internal Medicine.* United States: Saunders Philadelphia. 1995. 1664-1662.
- Fastard W. Bitch fertility after natural mating and after artificial insemination with semen fresh or frozen semen. *J Small Anim Pract.* 1984. 25: 561-565.
- Fastard W, Andersen-Berg K. Factors influencing the success rate of artificial insemination with frozen semen in the dog. *J Reprod Fertil.* 1989. 39:289-292.
- Fastard W. Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology.* 2000. 53: 175-186.
- Feldman EC, Nelson RW. *Canine and feline endocrinology and reproduction.* United States: Saunders. Philadelphia. 1987. 481-524.
- Fontbonne A. Ovulation, maturation ovocytairé et fecondation in vivo chez la chienne (In vivo ovulation, oocyte maturation and fertilisation in the bitch). PhD Thesis, Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech). 2008.
- Fosberg CL, Fosberg M. Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. *J. Reprod. Fertil.* 1989; 39, pp. 299-310.
- Fosberg CL. Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. *Vet Clin North Am.* 1991. 21: 467-485.
- Fosberg CL. Accurate monitory of the estrus cycle of the bitch for artificial insemination. *Proceedings 19th World Congress of the WASAVA.* 1994. 601-605.
- Fosberg CL. Artificial Insemination with semen fresh, chilled extended and frozen-thawed semen in the dog. *Seminar in Veterinary Medicine and Surgery.* 1996.10 (1): 48-58.
- Fosberg CL, Strom B, Govette G. Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: a retrospective study. *Theriogenology.* 1999. 52: 11-23.
- Günzel-Apel AR. Artificial insemination with frozen semen in the bitch: intrauterine insemination techniques. *Third conference of the European society for domestic animal reproduction.* 1999. 6: 71-72.
- Harrop AE. Mating natural service and artificial insemination in reproduction in the dog. *London (England): Tindall & Cox.* 1960. 87-89).
- Hayashi K, Morita R, Aso T, Ono M, Ohtaki T, Tanemura K, Watari T, Tsumagari S. Evaluation of transcervical insemination using frozen semen by flexible endoscope in dogs. *J Vet Med Sci.* 2013. 75 (3): 315-8.
- Held JP. Critical evaluation of the success and role of chilled and frozen semen in today's veterinary practice. *Proceedings of canine reproduction Symposium. American college of theriogenologist.* 1997. 49-59.
- Hori T, Matsuda Y, Kobayashi M, Kawakami E, Tsutsui T. Comparison of fertility on intrauterine insemination between cryopreserved ejaculated and cauda epididymal sperm in dogs. *J Vet Med Sci.* 2011. 73 (12):1685-8.
- Jewgenow K, Songsasen N. *Reproduction and advances in reproductive studies in carnivores. Adv Exp Med Biol.* 2014. 753: 205-39.
- Jhonston DJ, Kuztritz MVR, Olson P. *Canine and feline theriogenology.* United States: Saunders. 2001. 287-306.
- Johnston SD. Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital. *Vet. Clin. North. Am.* 1991. 21 (3):B545-551.
- Kirk RW. *Current Veterinary Therapy X: Small Animal Practice.* Philadelphia (United States): Saunders. 1989. 1247-1259.
- Kong IK, Choi SG, Bae HI, Oh DH, Oh HJ, Kim HR, Kin JK. Effect of addition of royal jelly in tris -buffer extender on the post -thaw viability of canine semen. *Theriogenology.* 2001.55:309.
- Lardy HA, Philips PH. Preservation of spermatozoa. *Proc Am Soc Anim Prod.* 32 ND Ann Meet, 1939. 219-231.
- Lindsay FE, Jeffcoate IA, Concannon PW. Vaginoscopy and fertile period in the bitch. *Proceedings 11th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination.* Dublin. 1988. 4-565
- Marshall F, Hugh A. *Reproduction in the male in Marshall's physiology of reproduction.* New York (United States): Churchill Livingstone. 1990. 769-775).
- Morrow DA. *Current Therapy in theriogenology: Diagnosis, Treatment and Prevention of Reproductive Disease in Animals.* Philadelphia (United States): Saunders. 1980. 661-665.
- Morton DB, Bruce SG. Semen evaluation, criopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs. *J Reprod Fertil.* 1989. 39:311-316.
- Nothling JO, Volkman DH. Effect of addition of autologous prostatic fluids on the fertility of frozen-thawed dog semen after intravaginal insemination. *J Reprod Fertil.* 1993. 47:325-327.
- Nöthling JO, Gerstenberg C, Volkman DH. success with intravaginal insemination of frozen-thawed dog semen. A retrospective study. *ASAfr Vet Ass.* 1995. 66 (2): 49-55.
- Nothling JO, Volkman DH. Semen quality after thawing: correlation with fertility and fresh semen quality in dogs. *J Reprod Fertil.* 1997. 51:109-116.
- Oettlé E.E. Sperm morphology and fertility in the dog. *J Reprod Fertil.* 1993. 47: 257-260.
- Romagnoli S, Lopate C. Transcervical artificial insemination in dogs and cats: review of the technique and practical aspects. *Reprod Domest Anim.* 2014. 4: 56-63.
- Rota A, Strom B, Fosberg CL. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. *Theriogenology.* 1995. 44: 885-900.
- Salamon S, Maxwell WMC. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci.* 2000: 62: 77-111.
- Savignone CA, Stornelli MA, Stornelli MC, Arauz MS, De la Sota RL. Estudio de la supervivencia espermática del semen almacenado a 4°C y 15°C en MRA® -yema de huevo. *Resúmenes del I Congreso Nacional de la Asociación de Veterinarios Especializados en Animales de Compañía de Argentina.* 2001. 165).
- Seager SWJ. Successful pregnancies utilizing frozen dog semen. *AI Digest.* 1969. 17: 6-7.

- Silva LDM, Onclin K, Lejeune B, Vestergren JP. Comparison of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen. *Vet Rec.* 1996. 154-157.
- Smith FO. Update on freezing canine semen, in Kirk RW (ed) *Current veterinary therapy IX.* United States, Philadelphia: BW. Saunders. 1986:1243-1248.
- Spallanzani L. *Observazione e esperienze in torno ai vermicelli spermatici del' uomo e degli animali.* Opuscoli di fisica animale e vegetabile opuscolo. II. Modena. 1976.
- Steckler D, Nöthling JO, Harper C. Prediction of the optimal time for insemination using frozen-thawed semen in a multi-sire insemination trial in bitches. *Anim Reprod Sci.*, 2013. 142 (3-4):191-7.
- Stornelli MA, Stornelli MC, Arauz MS, Savignone CA, García M, De la Sota RL. Estudio comparativo del efecto de tres diluyentes sobre la supervivencia de semen canino almacenado a 4°C. *Revista Brasileira de Reproducción Animal*, 2001. 25 (3):468-470.
- Stornelli MA. *Estudios de supervivencia y fertilidad de semen canino criopreservado.* Tesis doctoral. 2004.
- Szász F, Gábor G, Solti L. Comparative study of different methods for dog semen cryopreservation and testing under clinical conditions. *Acta Veterinaria Hungarica*, 2000. 48 (33): 325-333.
- Tsutsui T, Shimizu O, Ohara N. Relationship between the number of sperms and the rate of implantation in bitches inseminated into unilateral uterine horn. *J Vet Med Sci.*, 1989. 51:257-263.
- Tsutsui T, Hase M, Hori T, Komoriya K, Shimizu N, Nagakubo K, Kawakami E. Effect of addition of Orvus ES paste to frozen canine semen extender on sperm acrosomes. *J Vet Med Sci.*, 2000. 62 (5):537-538.
- Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *J Reprod Fertil*, 1995. 7: 781-791.
- Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci.*, 2000. 60:481-492.
- Wei YF, Chen FL, Tang SS, Mao AG, Li LG, Cheng LG, Chen C, Li FX, Wang B, Xu T, Zhang YJ, Li J, Wan JS. Birth of puppies of predetermined sex after artificial insemination with a low number of sex-sorted, frozen-thawed spermatozoa in field conditions. *Anim Sci J.* 2017; 88(8):1232-1238.
- Wildt DE. Laparoscopy. En Burke T. J. *Small Animal Reproduction and infertility.* United States, Philadelphia: Ed. Lea & Febiger. 1986. 121-140
- Wilson M. Non-surgical intrauterine artificial insemination in bitches using frozen semen. *J Reprod Fertil.*, 1993. 47: 307-311.