

Universidad Nacional de Costa Rica
Facultad de Ciencias de la Salud
Escuela de Medicina Veterinaria

Pasantía en La Clínica de Reproducción Canina de la Facultad de
Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional
Autónoma de México y Clínica Sanatorio Animal

Modalidad: Pasantía

Trabajo Final de Graduación para optar por el Grado Académico de
Licenciatura en Medicina Veterinaria

Autor:
Melissa Quesada Segura

Campus Presbítero Benjamín Núñez

2016

APROBACIÓN DEL COMITÉ ASESOR Y EXAMINADOR

Pasantía en La Clínica de Reproducción Canina de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México y
Clínica Sanatorio Animal

Rafael Ángel Vindas Bolaños, Lic.

Decano Facultad de Ciencias de la Salud

Laura Bouza Mora, MSc.

Subdirectora Escuela de Medicina Veterinaria

Laura Castro Ramírez, PhD.

Tutora

Jorge Chacón Calderón, PhD.

Lector

Marcela Suárez Esquivel, MSc.

Lectora

Fecha

DEDICATORIA

Para mi familia, que ha sido el motor y fortaleza para sacar adelante uno de mis mayores sueños desde pequeña: el convertirme en Médico Veterinario.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por darme vida, salud, capacidad y fuerza a lo largo de mi vida.

A mis padres por siempre hacer lo posible para que mis hermanos y mi persona cumplamos nuestros sueños e ideales.

A mis hermanos por ser un gran ejemplo de esfuerzo y perseverancia.

A todos mis amigos, compañeros y personas queridas que han formado parte de mi vida a lo largo del tiempo, creyendo en mí e impulsándome a ser mejor persona cada día; especialmente a las Marías, por hacer de la universidad una de las mejores épocas de mi vida.

A mi comité asesor, las doctoras Laura Castro, Marcela Suárez y el doctor Jorge Chacón, por ser una excelente guía y dedicarme tiempo y apoyo durante esta pasantía y proceso de graduación.

A las doctoras Rosa María Páramo y Brenda Salgado, por abrirme las puertas de sus clínicas y hacer posible esta pasantía; y a todo el equipo de Reproducción Canina de la Universidad Autónoma de México, por compartir sus conocimientos, amistad y hacerme sentir como en casa durante mi estancia.

RESUMEN

El uso de diversas técnicas para el manejo reproductivo en caninos ha cobrado gran relevancia en los últimos años. Por tanto, con el objetivo de fortalecer los conocimientos en procedimientos reproductivos en caninos, se participó durante nueve semanas en la Clínica de Reproducción Canina de la Universidad Nacional Autónoma de México y la Clínica Privada Sanatorio Animal.

Se dio seguimiento del ciclo estral en 165 hembras, a las que se determinó el momento de ovulación mediante medición de progesterona sérica y citologías vaginales exfoliativas. En 30 de ellas, se realizó inseminación artificial (IA): 15 intravaginales y 15 intrauterinas. Se efectuaron 38 diagnósticos de preñez por ultrasonido, de los cuales 30 fueron positivos.

Se colectó el eyaculado de 35 machos y se efectuó congelamiento de semen en seis ocasiones. Se participó en un total de 21 cesáreas, seis de las cuales fueron emergencias. Se asistió el parto de 84 cachorros en total, con una mortalidad del 9.5%. Además, se realizó manejo neonatal de 49 cachorros provenientes de 12 camadas.

Las experiencias generadas por la pasantía evidenciaron la importancia del seguimiento apropiado, tanto gestacional como neonatal en caninos empleados con fines reproductivos, con el fin de garantizar su bienestar, mejorar su desarrollo y desempeño reproductivo. Es indispensable que la reproducción canina sea una actividad regulada y guiada por médicos veterinarios debidamente capacitados en técnicas de manejo y mejoramiento reproductivo.

ABSTRACT

The use of techniques for the reproductive management of canines has become more important during the past few years. Therefore, this externship was carried out in order to improve the student's knowledge in this area. The externship was developed in the Clínica de Reproducción Canina de la Universidad Nacional Autónoma de México, and the private clinic Sanatorio Animal, during a period of nine weeks.

It included the estrus cycle follow up in 165 bitches, in which ovulation moment was estimated by serum progesterone measurements and vaginal cytology. It was carried out artificial insemination in 30 cases: 15 intravaginal and 15 intrauterine. Furthermore, ultrasonographic evaluation of 38 mated bitches was carried out; pregnancy was confirmed by this mean in 30 of them.

Besides, semen was collected from 35 males, and semen freezing was accomplished in six occasions. It was performed 21 caesarean sections, which included six procedures considered as emergencies. The birth of 84 puppies was assisted, with a mortality rate of 9.5%, and neonatal care of 49 puppies from 12 litters was assisted.

The veterinary training in reproductive techniques is crucial for an appropriate guidance of canine reproduction. By this way, the accomplishment of this externship improved the experience and knowledge on monitoring and enhancing procedures related to the reproductive and gestational performance, as well as the neonatal health of canines used for reproductive purposes and moreover, ensuring their welfare.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1.INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Justificación	3
1.3 Objetivos	5
<i>1.3.1 Objetivo General</i>	5
<i>1.3.2 Objetivos Específicos</i>	5
2. MATERIALES Y MÉTODOS	6
2.1 Lugar y periodo de pasantía	6
2.2 Animales Utilizados	7
2.3 Manejo de las hembras con fines reproductivos	8
2.4 Técnicas de biotecnología reproductiva realizadas	8
<i>2.4.1 Citología vaginal exfoliativa (CVE)</i>	8
<i>2.4.2 Medición de P₄</i>	9
<i>2.4.3 Inseminación artificial (IA)</i>	9
<i>2.4.4 Diagnóstico de gestación</i>	10
2.4.4.1 <u>Ultrasonografía</u>	10
2.4.4.2 <u>Estudio Radiográfico</u>	11
<i>2.4.5 Evaluación Andrológica</i>	12
2.4.5.1 <u>Colecta y evaluación del semen</u>	12
<i>2.4.6 Dilución del semen</i>	14
<i>2.4.7 Congelamiento del semen</i>	14

2.4.8 <i>Descongelamiento del semen</i>	17
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
3.1 Citología vaginal exfoliativa (CVE)	19
3.2 Determinación de P₄	22
3.3 Inseminación artificial	24
3.3.1 <i>Inseminación artificial intravaginal (IAIV)</i>	24
3.3.2 <i>Inseminación artificial intrauterina (IAIU)</i>	26
3.4 Diagnóstico de Gestación	27
3.5 Evaluación reproductiva del macho	30
3.6 Dilución, refrigeración y congelamiento de semen	38
4. CONCLUSIONES	42
5. RECOMENDACIONES	44
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
7. ANEXOS	53

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Fórmulas empleadas para determinación del tiempo aproximado de gestación	11
Cuadro 2. Procedimientos reproductivos realizados durante la pasantía	18
Cuadro 3. Resultados de CVE obtenidos durante la pasantía.	19
Cuadro 4. Resultados de gestación según método de fertilización en 30 hembras inseminadas en la Clínica Sanatorio Animal	27
Cuadro 5. Diagnósticos de gestación según medición ultrasonográfica verificada con fecha de último servicio en la Clínica Sanatorio Animal.	28
Cuadro 6. Evaluación reproductiva completa de siete machos	31
Cuadro 7. Evaluación reproductiva de 28 machos	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Citología vaginal exfoliativa de las cuatro etapas del ciclo estral de la perra, teñidas con Diff-quick®	20
Figura 2. Citología vaginal exfoliativa en etapa de estro con vaginitis teñida con Diff-quick®	21
Figura 3. Niveles de P ₄ en tres perras para calcular día de inseminación	23
Figura 4. Macho adulto pseudohermafrodita con historial clínico desconocido	33
Figura 5. Anomalías espermáticas.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

- CLIA: Quimioluminiscencia enzimática
- CVE: Citología Vaginal Exfoliativa
- DMP: Diámetro Biparietal
- FEIA: Inmunoanálisis enzimático con fluorescencia
- FSH: Hormona Folículo Estimulante
- IA: Inseminación Artificial
- IAIU: Inseminación Artificial Intrauterina
- IAIV: Inseminación Artificial Intravaginal
- LH: Hormona Luteinizante
- P₄: Progesterona sérica
- RIA: Radioinmunoensayo
- TG: Tiempo de Gestación
- TVT: Tumor Venéreo Transmisible
- SG: Diámetro del Saco Gestacional
- UAM: Universidad Autónoma de México
- UI: Unidades Internacionales
- UNAM: Universidad Nacional Autónoma de México

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

La domesticación de los caninos ocurrió hace más de 10,000 años, momento desde el cual el hombre ha manipulado la reproducción y evolución de dicha especie, creando una amplia variedad de razas, que sobrepasan los 400 tipos hasta el día de hoy. En el año 1960, Harrop describió la primera inseminación artificial (IA) exitosa con semen refrigerado y en 1969, Seager reportó la primera gestación a partir de IA con semen congelado, lo que aumentó exponencialmente el interés por el área de reproducción canina (Wayne y Vila, 2001; Farrell et al., 2015).

El manejo reproductivo de los caninos ha cobrado gran relevancia en los últimos años, especialmente por la dinámica de nuestras sociedades modernas, en donde esta especie es cada vez más numerosa y juega un rol afectivo y económico mayor. Esta práctica se apoya además, en el estudio de la fisiología reproductiva de los caninos, facilitando la implementación correcta de diferentes técnicas para su manejo reproductivo (Martí, 2011).

En mamíferos, la reproducción exitosa depende de la evolución satisfactoria de una serie de eventos como: la pubertad, ciclicidad, cópula, fecundación, gestación y atención posparto de la madre y el neonato (Senger, 2005). A su vez, se ha visto que la actividad reproductiva es una de las primeras funciones del organismo que se detiene o modifica ante factores como estrés, desbalances nutricionales o enfermedad (Walters, 2007).

En las perras, el ciclo estral se caracteriza por ser monoéstrico, no estacional, cuenta con cuatro etapas (proestro, estro, diestro y anestro) y tiene una duración promedio de cuatro a diez meses; condición que puede variar entre individuos (Kowalewsky, 2014). Al igual que en las

demás especies domésticas, el control primario de la función reproductiva se ejerce a través del eje hipotalámico-hipofisiario-gonadal y la secreción de las hormonas reproductivas se controla por medio de mecanismos de retroalimentación negativa o positiva (England et al., 2010; Aralla et al., 2013).

Dos de los factores que dificultan la determinación del momento idóneo para la fertilización son: (i) la variación en la duración del estro en las perras y (ii) la poca correlación entre el estado reproductivo y el comportamiento en algunas hembras; siendo esta última, la razón más frecuente de la falta de éxito en la reproducción canina (Davidson y Feldman, 2010). Por lo tanto, la implementación correcta de técnicas para la determinación del estado sexual del individuo, incrementa las posibilidades de fecundación (Moxon et al., 2010).

La importancia del control constante del sistema reproductor de las mascotas reside además en la prevención de patologías y complicaciones, ya que se evita el contagio de enfermedades infecciosas, se da diagnóstico temprano de alteraciones patológicas (procesos neoplásicos, hiperplasia quística endometrial o piómetra) y se anticipan partos distócicos mediante ultrasonido y radiografías (Mateus et al., 2010).

Para evaluar la condición reproductiva de la hembra es de vital importancia la integración de la anamnesis, la exploración física y de pruebas reproductivas específicas como la citología vaginal exfoliativa (CVE) y la medición de niveles de progesterona (P_4) (Páramo y Balcázar, 2005; Goericke et al., 2010). Para mejorar la fertilización, existen técnicas de reproducción asistida como las IA intravaginal, transcervical e intrauterina (Connor y Traas, 2009; Martí, 2011). Así mismo, existen herramientas para el diagnóstico de gestación como la

palpación abdominal, la ultrasonografía y el estudio radiográfico, que permiten un mejor seguimiento reproductivo (Gil et al., 2014).

Por otra parte, la capacidad reproductiva del macho, depende de eventos como la detección de la hembra, dominancia, monta, desenvaine, penetración y eyaculación de semen de buena calidad (Páramo y Balcázar, 2005). Por esto, la presencia de alteraciones anatómicas, desbalances en la nutrición, el desarrollo de patologías sistémicas o que afecten la integridad de sus órganos sensoriales y reproductores, son determinantes de la aptitud de un macho para la reproducción (Páramo, 2015). Además de una evaluación física completa, es recomendable valorar el libido y analizar la calidad del semen macroscópica y microscópicamente (Páramo y Balcázar, 2005; Root, 2014).

1.2. Justificación

A pesar de que en nuestro país existe el “Reglamento para la reproducción y tenencia responsable de animales de compañía” (Reglamento para la reproducción y tenencia responsable de animales de compañía, 2004), el control de la reproducción y sobrepoblación de caninos en el país aún no se ha logrado.

En Costa Rica, el manejo reproductivo y asistido por médicos veterinarios aún no es una práctica frecuente. Esto, a pesar de que ha aumentado la demanda de servicios veterinarios en el área de reproducción canina. Desde hace cuatro años aproximadamente, la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional está ofertando servicios de biotecnología reproductiva en la hembra, por lo que tanto la casuística como las técnicas ofrecidas han ido

incrementando paulatinamente. Asimismo, la Escuela tiene una importante trayectoria en el área de evaluación del macho, principalmente en bovinos.

Sin embargo, actualmente en nuestro país, la selección de animales para fines reproductivos continua realizándose sin una buena fundamentación, fomentado el cruce de animales que presentan características físicas agradables, sin tomar en cuenta si son portadores de patologías o características heredables no deseadas, tales como paladar hendido, labio leporino, ceguera o sordera congénita, epilepsia, cataratas, albinismo, displasia de cadera y codo, criptorquidismo, inercia uterina primaria, entre otras.

Además, en la mayoría de los casos las técnicas reproductivas como inseminaciones artificiales, colectas de semen y evaluaciones reproductivas son llevadas a cabo en criaderos sin el asesoramiento médico correspondiente; donde además, hace falta control sobre las condiciones de los recintos, capacitación de personal, control de enfermedades y en algunos casos se da la sobreexplotación de los animales. Lo anterior evidencia desconocimiento en el área y poca participación de médicos veterinarios para el mejoramiento las labores de reproducción canina.

Asimismo, en nuestro país existe un mercado creciente de compra y venta de cachorros de raza, lo que implica una mayor demanda de profesionales debidamente capacitados en técnicas de manejo reproductivo. Por lo tanto, con el fin de acentuar la capacitación profesional en el área de reproducción canina, se consideró muy valioso realizar una pasantía en el área de reproducción canina, con énfasis en la implementación de herramientas de manejo reproductivo.

Para ello, se contó con la oportunidad de realizar dicha pasantía en el Departamento de Reproducción de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

1.3. Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Fortalecer conocimientos y desarrollar habilidades en el uso de las principales técnicas para manejo y mejoramiento reproductivo en caninos.

1.3.2 Objetivos Específicos

1.3.2.1 Interpretar correctamente los niveles séricos de progesterona y la citología vaginal, para determinar de forma precisa la etapa del ciclo estral de hembras caninas y el momento idóneo para su inseminación.

1.3.2.2 Realizar valoraciones reproductivas en machos caninos para determinar su condición y eficiencia reproductiva, incluyendo la colecta y evaluación del semen.

1.3.2.3 Llevar a cabo procesos de refrigeración y/o congelamiento de semen.

1.3.2.4 Realizar el cruce de las hembras mediante monta natural o inseminación artificial.

1.3.2.4 Realizar diagnósticos y evaluaciones de preñez.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Lugar y periodo de pasantía

La pasantía se realizó en México, Distrito Federal, desde el dos de marzo del 2015 hasta el ocho de mayo del 2015. Se trabajó durante cinco días a la semana, con un total de 495 horas. Se cumplió un horario de 9:00 am a 2:00 pm en la Clínica de Reproducción Canina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y de 3:00 pm a 9:00 pm, en la Clínica de Reproducción y Neonatología Sanatorio Animal, ubicada en el Distrito Federal (Anexo 1).

Se participó en procedimientos de manejo reproductivo tales como: toma de Citología Vaginal Exfoliativa (CVE), interpretación de progesterona sérica (P_4), IA intravaginal e intrauterina, diagnóstico de gestación, manejo y tratamiento de patologías reproductivas, evaluación reproductiva del macho, refrigeración y congelamiento del semen.

Además, se tuvo la oportunidad de:

- i. Participar como instructora de práctica en el Taller de Reproducción Canina N° 16, impartido por el Departamento de Reproducción Canina de la UNAM a médicos veterinarios, del 20 al 21 de marzo del 2015 (Anexo 2).
- ii. Asistir a las clases de reproducción canina para estudiantes de la Universidad Autónoma de México (UAM), impartidas por la UNAM (9 al 13 de marzo).
- iii. Asistir a los cursos de “Profundización en Reproducción Canina”, para los estudiantes de licenciatura de la UNAM (23 al 27 de marzo).
- iv. Visitar el Criadero del Ejército (6 de abril).

- v. Asistir a las clases de Maestría de Medicina Veterinaria en Reproducción Canina, en los cursos de Reproducción y Nutrición Canina (durante las nueve semanas de pasantía).
- vi. Asistir a la conferencia de “Nutrición y alimentación del cachorro”, el día 13 de marzo del 2015 (Anexo 3).

Durante el periodo de la pasantía, se elaboró un portafolio llamado “Carpeta del Estudiante”, que es un requisito para aquellos estudiantes de la UNAM que realicen la Maestría, el Trabajo Profesional o el Servicio Social en el área de Reproducción Canina. En este portafolio se incluyó un resumen de las técnicas estudiadas, bitácoras, clases recibidas y artículos consultados durante el periodo de trabajo.

2.2 Animales utilizados

Se llevó a cabo el manejo reproductivo de 200 animales: 165 hembras y 35 machos de las razas Basset Hound, Bulldog Inglés, Bulldog Francés, Pug, Welsh Corgi, Rottweiler, Labrador Retriever, San Bernardo, West Highland White Terrier, Pomeranian, Pastor Alemán, American Staffordshire Terrier, Golden Retriever, Pastor Belga, Bóxer, Beagle, Chihuahua, Bull Terrier, Siberian Husky, Dachshund, Whippet, Mastin Inglés, Setter Irlandés, Yorkshire Terrier, Chow Chow y Mestizos. Las edades de los animales se encontraron en el rango de diez meses hasta siete años de edad.

2.3 Manejo de las hembras con fines reproductivos

A las hembras se les realizó una evaluación clínica y reproductiva general para verificar su estado nutricional y sanitario, y en algunos de los casos se descartó la infección con *Brucella canis*. Posteriormente, se dio seguimiento reproductivo basado en la determinación de la etapa estral mediante la toma periódica de CVE y la evaluación de los niveles de P₄, con el fin de estimar la fecha de ovulación y el momento idóneo de cruce.

2.4 Técnicas de biotecnología reproductiva realizadas

2.4.1 Citología vaginal exfoliativa (CVE)

Las CVE para el seguimiento del ciclo estral se obtuvieron empleando un hisopo de plástico flexible de 15 cm de longitud, con el cual se realizó una exfoliación del fondo vaginal que seguidamente se extendió sobre un portaobjetos limpio y se tiñó con Diff-Quick[®], según se detalla en el Anexo 4 (Páramo y Balcázar, 2005; Root, 2010). Seguidamente, se observaron al microscopio de luz convencional (10X) para su estudio (Johnston et al., 2001; Páramo y Balcázar, 2005). Las CVE fueron clasificadas de manera cualitativa según el predominio de la celularidad vaginal (células parabasales, intermedias, superficiales o anucleadas) y mediante la asignación de cruces de acuerdo con la presencia de eritrocitos (+: poca, ++: moderada y +++: abundante) (Root, 2010; Groppetti et al., 2012).

2.4.2 Medición de niveles de P₄

La medición de P₄ se realizó mediante la técnica de quimioluminiscencia enzimática, para ello se recolectó sangre de la vena cefálica o yugular, que posteriormente se separó mediante centrifugación a 3000 rpm. Se empleó alrededor de 0.5 ml de suero que fue procesado en un equipo IMMULITE 10000[®], de acuerdo con las indicaciones del fabricante (Diagnóstica Comercial, 2013).

2.4.3 Inseminación artificial (IA)

Las IA se realizaron mediante las técnicas intravaginal e intrauterina. La técnica seleccionada dependió de aspectos como el nivel de P₄ de la hembra, el empleo de semen congelado o fresco, así como las preferencias del propietario.

La inseminación artificial intravaginal (IAIV) con semen fresco se iniciaron en hembras con niveles de P₄ a partir de 7 ng/ml. Para ello, se depositó el semen diluido en el fondo de la vagina, empleando una jeringa adaptada a una pipeta para inseminación, siguiendo los pasos que se describen en el Anexo 5 (Martí, 2011; Páramo, 2015).

Por otro lado las inseminaciones artificiales intrauterinas (IAIU) con semen fresco se realizaron con niveles de P₄ de 14 ng/ml aproximadamente, mientras que las IAIU con semen descongelado se realizaron con niveles cercanos a los 20 ng/ml. Las IAIU se realizaron por medio de por laparotomía, siguiendo el procedimiento anestésico y la preparación necesaria para una cirugía.

Se ingresó a la cavidad abdominal mediante una incisión longitudinal en línea media, caudal al ombligo, a través de la cual se expusieron los cuernos uterinos, y se depositó el semen en su lumen con la ayuda de un catéter calibre 24.

El semen fresco depositado en útero incluyó la primera y segunda fracción y su volumen dependió del tamaño de la raza: (i) hasta los 0.5 ml en razas miniatura, (ii) 2 ml en razas pequeñas, (iii) 4-5 ml en razas medianas y grandes y (iv) 6 a 10 ml en razas gigantes (Anexo 6) (England y Von Heimendahl, 2010). Además, el semen empleado en la IAIU se precalentó a 37°C previo a su aplicación.

Cuando se empleó semen fresco se utilizó una concentración mínima de 1×10^8 espermatozoides/ml (Páramo 2005); mientras cuando se empleó semen congelado, se aplicaron pajillas con dosis entre 4×10^7 a 1×10^8 por pajueta. La concentración espermática de los eyaculados no fue evaluada previa a la inseminación, solamente se corroboró su porcentaje de motilidad.

2.4.4 *Diagnóstico de gestación*

2.4.4.1 Ultrasonografía

Las hembras fueron monitoreadas mínimo 30 días después de la última IA con el fin de diagnosticar gestación mediante el uso de ultrasonido; se empleó un transductor microconvexo de 7.5 MHz.

Para el procedimiento se rasuró el área abdominal y se posicionaron las pacientes en cuadripedestación; se ubicó la vejiga como punto de referencia y en dirección craneal se ubicó

el útero. Se evaluó el contenido de ambos cuernos para ubicar las vesículas amnióticas con estructuras embrionarias en el fluido anecoico, y se realizó el conteo mínimo de embriones o fetos visualizados en cada cuerno.

Se revisó la viabilidad de cada uno de los mismos mediante la medición de la frecuencia cardiaca. Se determinó el tiempo aproximado de gestación (TG) mediante la medición del diámetro del saco gestacional (SG) en gestaciones menores al día 40 y el diámetro biparietal (DBP) en gestaciones avanzadas; con estos datos se aplicó una de las siguientes fórmulas indicadas en el Cuadro 1 (Mattoon y Nyland, 2015).

Cuadro 1. Fórmulas empleadas para determinación del tiempo aproximado de gestación.

Gestación temprana (<40 d)	Gestación avanzada (>= 40 días)
$T.G. (\pm 3d) = SG \times 6 + 20$	$T.G. (\pm 3d) = DBP \times 15 + 20$
T.G: Tiempo de gestación SG: Saco Gestacional (cm) DBP: diámetro biparietal (cm) d: días	
Fuente: Mattoon y Nyland, 2015.	

2.4.4.2 Estudio radiográfico

Con el fin de determinar el riesgo de una distocia en gestaciones avanzadas, se llevó a cabo un estudio radiográfico a partir del día 58 (Feldman y Nelson, 2007; Páramo, 2015), utilizando una toma látero-lateral y una ventro-dorsal de las pacientes. Se midió el DBP de todos los fetos que se observaron y se comparó con la distancia del diámetro pélvico interno de la madre (Páramo, 2005; Reichler y Michel, 2009).

2.4.5 *Evaluación andrológica*

La evaluación reproductiva de los machos incluyó un examen clínico general, evaluación de los genitales internos y externos, del libido y del semen (Páramo, 2008).

Para el examen clínico general se tomó en cuenta el historial clínico, medicamentos administrados, lesiones sufridas, nutrición; así como el examen objetivo general del paciente determinando parámetros básicos de frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, temperatura, color de membranas mucosas y llenado capilar (Páramo, 2008).

Posteriormente se realizó un examen detallado del tracto genital, iniciando con la revisión de la integridad del escroto; valoración de los testículos (forma, simetría, posición y consistencia), del epidídimo (consistencia y tamaño de la cola del epidídimo), del prepucio (integridad y posibilidad de retracción), del pene (aspecto e integridad de la mucosa) y se realizó palpación trans rectal de la próstata (Root, 2014; Páramo, 2015).

Seguidamente se evaluó el libido, utilizando una hembra en celo o mediante el uso de materiales impregnados con secreciones vaginales, valorándose el comportamiento de dominancia y monta (Páramo, 2008; Root, 2014; Páramo, 2015).

2.4.5.1 Colecta y evaluación del semen

La colecta del semen se realizó por estimulación manual del glande del pene, acompañada de la retracción del prepucio. Se colectaron la primera y la segunda fracción del eyaculado, empleando un cono de plástico (Laboratorio de Reproducción Canina, UNAM) o un

recipiente de vidrio (Clínica Sanatorio Animal) atemperado a 37°C. La tercera fracción del eyaculado no fue colectada.

Seguidamente, se aplicó gel lubricante y se verificó que el animal envainara completamente el pene dentro del prepucio. El semen se depositó en un frasco de vidrio color ámbar a 37°C (Páramo, 2008; Root, 2010; Páramo, 2015).

El examen macroscópico del eyaculado evaluó el volumen, el pH (con tiras reactivas), así como su color y aspecto (Rijsselaere et al., 2003; Páramo y Balcázar, 2005; Prinosilova y Kopecka, 2012).

En la evaluación microscópica se valoró lo siguiente:

i. Motilidad:

Se depositó una gota del semen en un portaobjetos cubierto con un cubreobjetos a 37°C y se observó al microscopio de luz convencional en aumento de 10X. Se consideró aceptable una motilidad progresiva igual o mayor a 70% (Páramo, 2008; Kim et al., 2010).

ii. Morfología:

Se mezcló una gota de semen y una gota de tinción de eosina-nigrosina para realizar un frotis el cual fue observado al microscopio a 40X. (Páramo, 2008; Kim et al., 2010). Se identificó el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos mediante el cambio en su tonalidad a un color violeta. Además, se contabilizó el porcentaje de anomalías primarias (doble cabeza, doble cola, macrocefalia, microcefalia, colas enrolladas y gota citoplasmática proximal) y secundarias (colas o cabezas sueltas, colas dobladas y gota

citoplasmática distal), ambas evaluaciones a partir de 100 espermatozoides en aumento de 40X (Feldman y Nelson, 2007; Kim et al., 2010).

iii. Concentración:

Para la determinación de la concentración espermática, el eyaculado se diluyó en proporción 1:200 con solución de formalina buferada al 5%. Mediante el uso de una cámara de Neubauer, se llevó a cabo el conteo de los espermatozoides según se especifica en el Anexo 7. Se calculó el promedio de espermatozoides de las dos cuadrículas y el resultado se multiplicó por el factor de dilución, en este caso 5000 (Sánchez et al., 2006; Restrepo et al., 2009; Páramo, 2015).

2.4.6 Dilución de semen

El semen recolectado se mantuvo en un baño maría a 37°C. Como diluyente se utilizó leche ultra pasteurizada y descremada con 0.006 g de penicilina. La dilución se realizó en una proporción de 1:1, agregando lentamente el diluyente al semen, dejándolo correr por las paredes del recipiente. La mezcla se envasó en viales color ámbar de 1 a 3 ml y se mantuvo a 4°C. El semen se pudo conservar de esta forma durante dos a tres días (Stornelli et al., 2001; Páramo, 2005; Baran et al., 2012).

2.4.7 Congelamiento del semen

Los eyaculados empleados para congelamiento de semen debían contar con una concentración mínima de 2×10^8 espermatozoides/ml, una motilidad mayor a 80%, estar libres de eritrocitos, y mostrar 85% de morfología normal como mínimo (Kim et al., 2010).

Para el congelamiento se preparó una solución madre de diluyente a base de lactosa-yema de huevo de acuerdo con el protocolo establecido en la clínica (Páramo y Balcázar, 2005). Esta preparación contenía 5.5 g de lactosa en 50 ml de agua bidestilada a la que se agregaron 10 ml de yema de huevo fresco. Se colocaron 10 ml de esta solución a cada uno de cinco tubos de ensayo. El primer tubo se mantuvo sin glicerol, y a los demás se agregó glicerol en forma creciente, a saber: 0.6 ml, 0.9 ml, 1 ml y 1.5 ml, esto para obtener una concentración final progresiva de glicerol al 8% (Anexo 8).

Luego de obtener el semen, se calculó el número de pajillas (NP) y volumen de diluyente (VD) que debía ser tomado de cada uno de los tubos de ensayo preparados con antelación. Para estos se aplicaron las siguientes fórmulas:

$$NP = \frac{(\% \text{ motilidad})(\text{concentración})(\% \text{ spz normales})(\% \text{ spz vivos})(\text{vol})}{\text{concentración deseada}}$$

$$VD \text{ por tubo} = \frac{(\text{vol por pajilla})(NP) - (\text{ml de precipitado})}{5}$$

Concentración: millones/ml
 spz: espermatozoides
 vol: volumen en ml
 concentración deseada: 2×10^8 /ml

El semen colectado se mantuvo a 37°C y se centrifugó durante cinco minutos a 2500rpm. Se desechó el sobrenadante y se le agregó el diluyente al pellet de semen, depositando el volumen necesario del tubo de ensayo sin glicerol. A partir de este punto todo el proceso se

realizó en frío (4°C) y se procuró que las soluciones de diluyente se mantuvieran a la misma temperatura que el semen. Luego de 30 min se agregó el volumen del segundo tubo de ensayo y así sucesivamente con los tres tubos restantes (Anexo 8).

La motilidad progresiva se verificó al finalizar, y se consideró normal una disminución $\leq 30\%$ (Manosalva et al., 2005; Silva et al., 2005). La mezcla se refrigeró 30 min más y se prosiguió con el llenado de pajillas de 0.5ml con ayuda de una jeringa de un mililitro, sin émbolo de hule y se sellaron con alcohol polivinílico. El promedio de concentración por pajilla utilizado fue de 2.2×10^8 (rango 3.3×10^8 a 1×10^8) espermatozoides (Anexo 8).

Las pajillas fueron congeladas por ocho minutos con vapor de nitrógeno líquido (-90°C) mediante su colocación sobre una gradilla de metal dentro de una hielera a una distancia de siete centímetros del nitrógeno. Seguidamente, las pajillas se sumergieron en el nitrógeno líquido durante tres minutos y se almacenaron en un termo con nitrógeno líquido (-196°C) para su posterior utilización (Páramo y Balcázar, 2005; Sánchez et al; 2006).

2.4.8 Descongelamiento del semen

El descongelamiento del semen se realizó introduciendo las pajillas en agua a 37°C, durante 20 segundos. Seguidamente se valoró su viabilidad mediante la evaluación de la motilidad del semen (Kim et al., 2010).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante la pasantía se participó en diferentes técnicas de manejo reproductivo en 200 caninos adultos, de los cuales el 82.5% (n= 165) fueron hembras y 17.5% (n=35) machos. Los procedimientos reproductivos realizados en adultos se detallan en el Cuadro 2.

Cuadro 2: Procedimientos reproductivos realizados durante la pasantía.

Procedimiento	Cantidad	Porcentaje
Determinación de P ₄	261	44.1
Citología vaginal exfoliativa	195	32.9
Ultrasonido	38	6.4
Colecta de semen	35	5.9
Cesárea	21	3.5
Inseminación artificial intravaginal	15	2.5
Inseminación artificial intrauterina	15	2.5
Congelamiento de semen	6	1.1
Radiografía	4	0.7
Ovariohisterectomía	2	0.3
Cirugía de prolapso vaginal	1	0.2

Fuente: Laboratorio de Reproducción Canina y Clínica Sanatorio Animal. México, DF. 2015.

Como se observa en el Cuadro 2, la casuística reproductiva que se maneja en estos centros es considerable, evidenciando una importante cultura de asistencia veterinaria en el manejo reproductivo canino.

México se considera uno de los países latinoamericanos con mayor población canina, según indica el último censo realizado por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía de dicho país, ésta supera los dieciocho millones de caninos; donde uno de los principales problemas, al igual que en Costa Rica, ha sido el control de la reproducción. En consecuencia,

se ha impulsado el interés por el desarrollo de profesionales preparados en la reproducción asistida y controlada de perros (Páramo y Balcázar, 2005; Anónimo, 2014).

Dentro de los procedimientos reproductivos llevados a cabo, el número de mediciones de P₄ sobrepasa en gran medida al de las CVE realizadas, ya que en la mayoría de los casos se tomó una CVE inicial para verificar la etapa del ciclo estral, posterior a lo cual se realizaron mediciones de P₄ para dar seguimiento y estimar el momento de la ovulación.

3.1 Citología Vaginal Exfoliativa (CVE)

Del total de 195 CVE realizadas, 161 se obtuvieron de 140 hembras a las cuales se les realizó un seguimiento de su ciclo estral con el objetivo de lograr su fertilización, acompañado por las mediciones de P₄ pertinentes. Las restantes 34 se obtuvieron en diferentes prácticas estudiantiles. Los resultados obtenidos se desglosan en el siguiente cuadro:

Cuadro 3. Resultados de CVE obtenidos durante la pasantía.

Etapa del ciclo estral	Número de muestras recolectadas	Criterio de discriminación
Proestro temprano	5	Predominio de células parabasales e intermedias, unidas entre sí presencia de eritrocitos (Figura 1A y 1B).
Estro	181	Predominio de células superficiales y anucleadas. (Figura 1, C y D)
Diestro	3	Predominio de células parabasales, intermedias y células diestrales. (Figura 1E)
Anestro	6	Poca cantidad de células parabasales e intermedias además de muco. (Figura 1F)

Fuente: Este estudio.

Las hembras en proestro mostraron vulvas edematizadas y secreción serosanguinolenta que inició uno a tres días previos a la toma de la muestra. Las CVE se clasificaron de acuerdo

con el predominio de células intermedias y parabasales, así como eritrocitos y detritos celulares (Figura 1A y 1B).

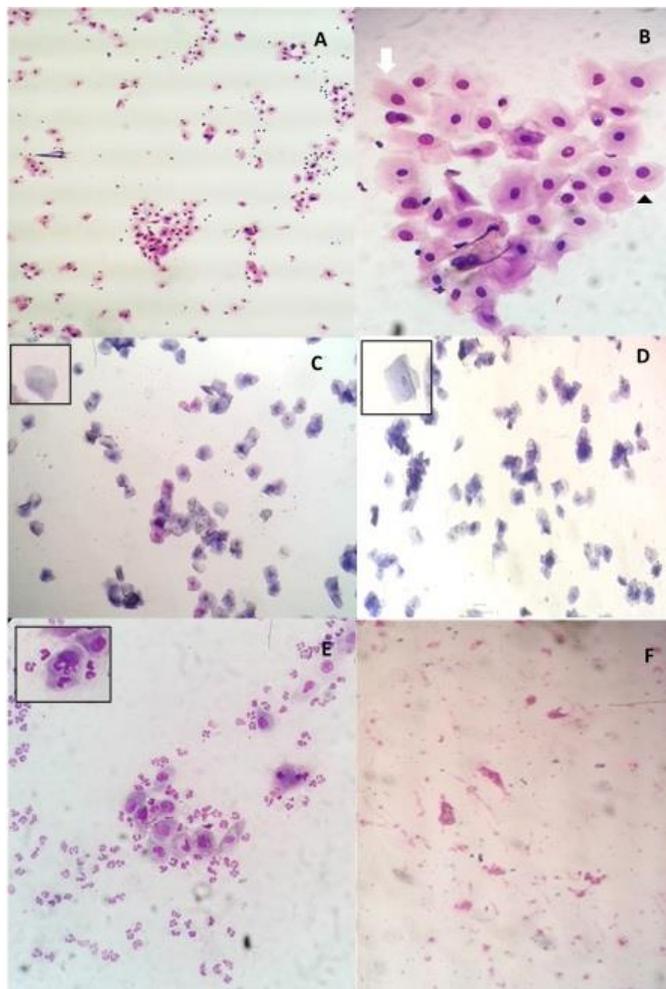


Figura 1. Citología vaginal exfoliativa de las cuatro etapas del ciclo estral de la perra teñidas con Diff-quick®. A) CVE en proestro, con predominio de células parabasales e intermedias, unidas entre sí, 10X. B) CVE en proestro, con eritrocitos (cabeza de flecha negra), célula parabasal (cabeza de flecha) y célula intermedia (flecha blanca), 40X. C) CVE en etapa de estro, células superficiales y anucleadas, 10X. Recuadro: célula anucleada (su núcleo no se tiñe), 40X. D) CVE en etapa de estro, células superficiales y anucleadas, 10X. Recuadro: Célula superficial, 40X. E) CVE en etapa de diestro con vaginitis, células parabasales, intermedias y gran cantidad de neutrófilos, 10X. Recuadro: célula diestral, 40X. F) CVE en etapa de anestro, células parabasales e intermedias en poca cantidad y abundante presencia de moco, aumento 10X. Fuente: Lab. Reproducción Canina UNAM. México, DF. 2015.

En el estro, la receptividad de las hembras fue la esperada en la mayoría de los casos, no obstante es bien sabido que algunas hembras pueden no aceptar al macho en ningún momento (Paramo, 2015). Dentro de los signos asociados a dicha etapa se encuentran la vulva edematizada a normal y el sangrado puede continuar al inicio de esta etapa. En perras, el estro tiene una duración que oscila entre los tres y los 20 días (Páramo, 2008).

Mediante el estudio de CVE fue posible diagnosticar vaginitis durante estro en cinco pacientes, en las cuales se observó “puntilleo” en el fondo del frotis (Figura 2A). En estas pacientes se instauró un tratamiento con clindamicina tópica (óvulos intravaginales), posterior a lo cual disminuyó del “puntilleo” (Figura 2B).

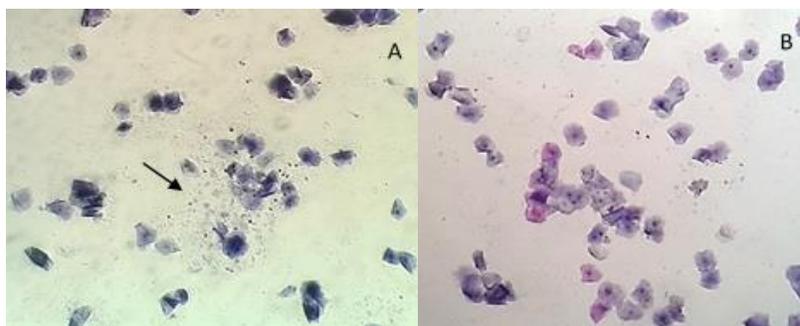


Figura 2. Citología vaginal exfoliativa en etapa de estro en una perra con vaginitis; teñida con Diff-quick®. A) Células superficiales, anucleadas, eritrocitos y puntilleo rodeando las células (flecha), 40X. B) Citología en la misma perra, posterior a tres días de tratamiento con clindamicina en óvulos, 40X. Fuente: Clínica Sanatorio Animal. México, DF. 2015.

La CVE también permite diagnosticar la presencia de afecciones tales como tumor venéreo transmisible (TVT) en el epitelio vaginal, determinando la presencia de células neoplásicas en el frotis (Baştan et al., 2008).

Durante la pasantía no se presentó ningún caso de TVT, no obstante fue posible el estudio de dichas citologías durante las clases de reproducción recibidas y el estudio de las láminas que tiene la Clínica de Reproducción Canina de la UNAM.

3.2 Determinación de P₄

Durante la práctica se realizaron un total de 261 mediciones de P₄, de las cuales 249 se realizaron para determinar el momento estimado de ovulación y/o inseminación (Anexo 9). Se realizaron en promedio cuatro mediciones de P₄ por hembra, previas a la inseminación artificial, en intervalos de dos a cuatro días.

Al momento de la ovulación la P₄ se encuentra entre 4 y 10 ng/ml, evento que ocurre entre 48 a 60 horas posteriores al pico de LH. El momento preciso de la ovulación se estima al detectar la duplicación de los niveles de la P₄ (Figura 3, Perra 1) (Feldman y Nelson, 2007).

Una de las observaciones más relevantes en esta práctica, fue que las primeras mediciones de P₄ en 27 hembras se encontraban en niveles inferiores a 0.5 ng/ml, a pesar de mostrar CVE con una celularidad típica de estro. Esto puede explicarse ya que según Feldman y Nelson (2007), la presencia de más del 80% de células superficiales en una CVE puede preceder al estro verdadero en tres a seis días, evidenciando la utilidad y relevancia de complementar la CVE con mediciones de P₄, para lograr un manejo reproductivo más exacto y efectivo.

Los incrementos diarios de P₄ varían entre individuos; sin embargo, según la experiencia adquirida en comportamiento hormonal en la Clínica Sanatorio Animal a través de los años, se

estima que la P_4 se incrementa entre 1 a 1.5 ng/ml aproximadamente cada 24 horas (Figura 3); esta estimación es utilizada para guiar la toma de muestras.

De acuerdo con la experiencia de las clínicas visitadas se describe que la mayoría de hembras de raza grande o gigante sufren incrementos hormonales de manera más lenta, mientras que las hembras Bulldogs Inglés muestran incrementos súbitos con ovulación temprana, cuando muestran ~4 ng/ml de P_4 ; estas observaciones aún no han sido publicadas.

Las IA se llevaron a cabo tomando en consideración los niveles de P_4 de la hembra y la disponibilidad de semen fresco o descongelado (Figura 3).

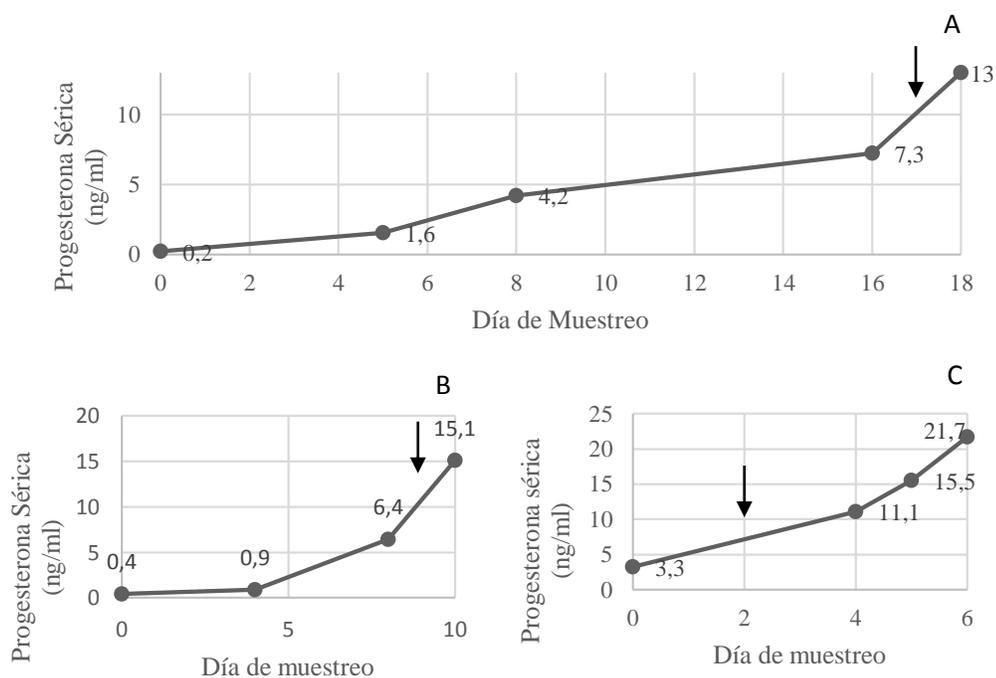


Figura 3. Niveles de P_4 en tres perras en relación con el día de inseminación. A: IAIV con semen fresco. B: IAIU con semen fresco. C: IAIU con semen descongelado. La flecha representa el día estimado de ovulación. La IA se llevó a cabo el día de la última medición en todos los casos. Fuente: Este estudio.

Según Payan y colaboradores, (2011), la supervivencia del semen canino en el tracto reproductivo de la hembra es de cuatro a seis días para semen fresco y 24 a 72 horas para semen refrigerado, por lo que se recomienda que la IA se realice con niveles de ocho a 15 ng/ml; sin embargo, con el paso del tiempo disminuye sensiblemente la longevidad de los espermatozoides. Además, se estima que en el semen descongelado, debido a los efectos del proceso de congelamiento, la duración del proceso de capacitación es menor y se acorta el periodo de supervivencia (12 a 24 horas) en el tracto femenino (Payan et al., 2011).

Por tanto, se recomienda realizar la IAIU con semen descongelado cuando los oocitos se encuentren maduros (en metafase II) y los niveles de P₄ sean de 18 a 28 ng/ml (Payan et al., 2011).

Kong y colaboradores, (2003), recomiendan la IA con niveles de P₄ entre los 10 a los 22 ng/ml, lo cual concuerda con el manejo realizado durante la pasantía. Pereira y colaboradores, (2012), reportan IAIU satisfactorias con niveles de P₄ de 9.9 ng/ml, 19.1 ng/ml y 32.9 ng/ml, mientras que en la Clínica de Reproducción Canina Sanatorio Animal han logrado fertilizaciones satisfactorias en pacientes con un máximo de 26 ng/ml.

3.3 Inseminación artificial (IA)

3.3.1 Inseminación Artificial Intravaginal (IAIV)

Durante la pasantía se llevó a cabo la IAIV de 15 hembras, empleando semen fresco y repitiendo la IAIV 48 horas después; de las cuales fue posible realizar un diagnóstico de preñez temprano en cuatro de las hembras inseminadas, comprobando la gestación de las mismas. En

las restantes 11 hembras los seguimientos de gestación no se realizaron en la clínica, ya que únicamente se les solicitó el servicio de inseminación.

Las razas involucradas en las IAIV fueron: Bulldog Inglés (n=10), Basset Hound (n=1), Dachshund (n=1), Rottweiler (n=1), Pomeranian (n=1) y Setter Irlandés (n=1). La mayor cantidad de IAIV (66.7%) en hembras de la raza Bulldog inglés, se explica por la dificultad que presenta esta raza para llevar a cabo una monta natural satisfactoria. En tres de las hembras, se llevó a cabo la IAIV por dominancia de la hembra.

El éxito de la IA depende de factores tales como: i) el estado de salud y nutricional del animal, ii) llevar a cabo las IA en el momento idóneo; iii) la calidad del semen utilizado y iv) técnica del IA que se emplee (Páramo, 2015).

Stornelli y colaboradores, (2001), reporta porcentajes de preñez en IAIV con semen fresco de 83.8%, en comparación con un 84.4% con monta natural, lo que sugiere que no existe una diferencia importante entre ambas técnicas.

Entre las ventajas de la IAIV se incluyen que es: una técnica accesible, de fácil realización, que no requiere de materiales costosos ni equipo especializado, permite el cruce de animales que se encuentren separados por distancias geográficas grandes, puede emplearse como alternativa en hembras dominantes que no permiten la monta natural, o en machos que por condiciones físicas o de tamaño no pueden realizar la monta y previene el contagio de enfermedades de transmisión sexual tales como el tumor venéreo transmisible (Stornelli et al., 2001; Feldman y Nelson, 2007, Páramo, 2015).

3.3.2 Inseminación artificial intrauterina (IAIU)

Del total de 15 IAIU, ocho se realizaron con semen descongelado y siete con semen fresco. El semen fresco se utilizó en aquellas hembras que presentaron valores de P₄ cercanos a 10 ng/ml y por preferencia de los propietarios o criadores. Durante la pasantía fue posible realizar diagnóstico de preñez en cuatro de las hembras inseminadas en forma intrauterina con semen fresco, obteniendo tres hembras gestantes y una no gestante.

Las IAIU mediante laparatomía fueron llevadas a cabo en las razas Bulldog Inglés (n=13), San Bernardo (n=1) y Golden Retriever (n=1). La técnica laparoscópica es una opción para aquellos pacientes que presenten vaginitis, además de que permite evaluar de manera directa el estado del útero y es un procedimiento rápido y fácil para médicos con experiencia quirúrgica (Thomassen y Farstad, 2009). Sin embargo, es una técnica invasiva, que involucra el sometimiento del paciente a un proceso de anestesia y acceso abdominal, lo que dificulta su realización en forma repetida. De hecho, es una técnica está prohibida en Europa, ya se considera una intervención quirúrgica innecesaria (Thomassen y Farstad, 2009).

La IAIU transcervical es una alternativa exitosa para el procedimiento laparoscópico, ya que al ser una técnica no invasiva que puede realizarse de manera repetida, no expone a la perra a los riesgos anestésicos y quirúrgicos; sin embargo, requiere equipo de endoscopía y personal capacitado para llevarla a cabo en forma satisfactoria (Stornelli et al., 2001; Feldman y Nelson, 2007). No se realizó ningún procedimiento de IAIU transcervical durante la pasantía.

El 76.7% de las inseminaciones artificiales (intravaginales e intrauterinas) fueron realizadas en la raza Bulldog Inglés. Esta raza se caracteriza por presentar dificultades para

cruzarse por monta natural, así como gran predisposición a partos distócicos, siendo necesario realizar cesárea en un 94.8% de los casos (Wydooghe et al., 2013).

3.4 Diagnóstico de gestación

En total se efectuaron 38 ultrasonidos: 11 entre los días 30 y 40 de gestación, y 27 entre los 40 y 60 días de gestación (Cuadro 4). Treinta de las hembras recibieron IA en la clínica Sanatorio Animal, de las cuales 24 se encontraron positivas.

Cuadro 4. Resultados de gestación según método de IA en 30 hembras inseminadas en la Clínica Sanatorio Animal.

	Diagnóstico de preñez positivo	Diagnóstico de preñez negativo
IAIV	11	3
IAIU	13	3
Total	24	6
IAIV: inseminación artificial intravaginal	IAIU: inseminación artificial intrauterina	

Fuente: Este estudio.

La utilización del ultrasonido tiene grandes ventajas, tales como facilitar el diagnóstico temprano de gestación, conocer la viabilidad de los cachorros y evaluar las frecuencias cardíacas de los fetos, que sirven como indicador de estrés fetal, para decidir si corresponde o no la realización de una cesárea (Cuadro 5). Se considera estrés fetal leve con frecuencias cardíacas entre los 220 a los 180 lpm, mientras que estrés fetal severo con frecuencias cardíacas menores a 180 lpm (Gil et al; 2014).

Cuadro 5. Diagnósticos de gestación en nueve hembras según medición ultrasonográfica verificada con fecha de último servicio en la Clínica Sanatorio Animal.

Raza	Diámetro promedio de SG o DBP (cm)	Días de gestación	P ₄ preparto (ng/ml)	Frecuencia cardiaca promedio (lpm)	Número de cachorros nacidos
Bulldog Inglés	2.7	60 ± 3	2.4	230	6 vivos
Bulldog Inglés	2.1	52±3	NSR	230	2 vivos
Bulldog Inglés	0.1	59 ± 3	NSR	210	2 vivos
Bulldog Inglés	0.1	39 ± 3	NSR	NSR	9 (8 vivos)
Bóxer	2	50 ± 3	1,1	220	8 vivos
Bulldog Inglés	2.6	59	0.9	238	4 (3 vivos)
Bulldog inglés	2	32 ± 3	NSR	NSR	1 vivo
Bulldog Inglés	2.8	62	1,8	135	4 vivos
Yorkshire terrier	2.8	62	0,6	220	5 vivos

DB: diámetro bipariental SG: saco gestacional lpm: latidos por minuto NSR: No se realizó

Fuente: Este estudio.

Tomando en consideración los diagnósticos de preñez positivos posteriores a IA realizadas en la clínica Sanatorio Animal (previo y durante la pasantía), el éxito de la fertilización en general, fue de un 80% (n=24/30). Los resultados obtenidos según procedimiento de IA indican que la tasa de preñez fue de 78.6% (n=11/14) en hembras inseminadas mediante IAIV (semen fresco), y de 81.3% (n=13/16) en hembras inseminadas mediante IAIU (semen fresco).

Los resultados obtenidos entre las dos técnicas se consideran similares en cuanto a efectividad, no obstante dada la poca cantidad de casos, no es posible realizar un análisis más profundo.

En un estudio realizado por England y Millar (2008), reportan tasas de preñez de IAIV con semen fresco es de $80\% \pm 16$ y semen congelado $45\% \pm 24$. No obstante, en este mismo estudio, se reportan tasas de preñez de $95\% \pm 7$ mediante IAIU quirúrgica con semen congelado, resultando similar a los resultados obtenidos con IAIU empleando semen fresco, cuya tasa de preñez es del $97\% \pm 4$, lo que demuestra la efectividad del empleo de semen congelado depositado en útero.

En el proceso de inseminación artificial son importantes el tipo de técnica de IA utilizada (IAIV o IAIU) y el procesamiento del semen (fresco, refrigerado o descongelado). Con semen descongelado, debido a su menor viabilidad, solo se recomienda realizar la IA de forma intrauterina (Payan et al; 2011).

A pesar de que el éxito general de fertilización de la clínica visitada durante la pasantía es bueno (80%), puede ser mejorado mediante una optimización en las técnicas empeladas y una evaluación más exhaustiva de los eyaculados previos a las inseminaciones, ya que sin estos datos es imposible determinar cuál es el factor que esté afectando la efectividad del proceso (Feldman y Nelson, 2007).

Debe rescatarse que el porcentaje real del éxito de fertilización se desconoce, ya que en muchos de los casos en la clínica es solicitado únicamente el procedimiento de inseminación, dando el seguimiento gestacional en otras clínicas.

3.5 Evaluación reproductiva del macho

Las evaluaciones andrológicas fueron realizadas en siete individuos de un total de 35 machos referidos para examen (Cuadro 6): 14 para evaluar su capacidad reproductiva y para prácticas de licenciatura, 15 para colecta de semen con fines de IA y seis para congelamiento de semen.

A los 28 pacientes restantes, únicamente se les realizó una valoración clínica, genital, de libido, y un examen parcial de su espermograma basado en la valoración de la motilidad espermática y un cálculo subjetivo visual de la concentración espermática. Lo anterior debido a que ya se les había hecho una evaluación completa en otra ocasión o porque los propietarios no deseaban costear la realización del examen andrológico completo (Cuadro 7).

Todos los exámenes clínicos generales se realizaron con normalidad, excepto por un canino de raza Whippet (Cuadro 7, individuo 1) que presentaba claudicación leve pues había sido atropellado hace dos años y recibió medicación prolongada con corticosteroides. Este macho tenía historia de haber estado con una hembra en celo por varios días y había intentado múltiples montas insatisfactorias. A la palpación de los testículos, este macho presentó una disminución marcada en la consistencia, lo que es sugestivo de degeneración, inflamación crónica o hipoplasia, entre otros (Feldman y Nelson, 2007).

Está ampliamente documentado que la administración prolongada de corticosteroides produce una disminución en la secreción de las gonadotropinas hipofisarias, generando problemas de infertilidad (Gradil et al., 2006).

Cuadro 6: Evaluación reproductiva completa de siete machos.

	Información del macho				Evaluación del semen						
	N	Raza	Edad (años)	Libido	Macroscópica		Microscópica				
					Vol (ml)	Color	Mot (%)	AEP	AES	Muertos (%)	Concentración (x10 ⁹ /ml)
EAR	1	Bulldog Inglés	3	B	1.5	BL	80	23	10	5	0.2
	2	Bulldog Inglés	1	E	2.5	BL	80	0	4	5	0.4
IA con semen congelado	3	Bulldog Inglés	3	E	1.5	BL	80	0	11	5	1.5
	4	Bulldog Inglés	2	E	2	BL	90	0	6	3	0.3
	5	SDR	5	B	1.5	BL	80	0	2	3	0.2
	6	Poodle	4	B	0.5	BL	65	0	4	6	0.1
	7	SRD	3	B	1.5	BL	80	0	5	2	0.1

AEP: Anomalías espermáticas primarias

AES: Anomalías espermáticas secundarias

B: Bueno

BL: Blanco lechoso

E: Excelente

EAR: Evaluación para aptitud reproductiva

IA: inseminación artificial

N: número de individuo

Mot: Motilidad espermática

SRD: sin raza definida

Vol: volumen

Fuente: Este estudio

Cuadro 7. Evaluación reproductiva de 28 machos para IA con semen fresco.

	Información del macho			Evaluación			
	N	Raza	Edad (años)	Libido	Macroscópica		Microscópica
					Vol (ml)	Color	Mot (%)
EAR	1	Whippet +	4	E	1.5	Rojo	-
	2	SRD	5a	B	0.5	BL	90
	3	Pit Bull	1.7	B	2.5	BL	80
	4	Bulldog Inglés	7	E	2	BL	90
	5	Pug	2	B	5	BL	90
	6	Schnauzer	6	B	0.5	BL	90
	7	French Poodle *	3	B	1	BL	-
	8	Schnauzer §	3	NA	NA	NA	NA
	9	Dachshund	6	B	1.5	Rojo	80
	10	Chihuahua	2	B	0.5	BL	80
	11	Pastror Belga	3	E	2.5	BL	90
	12	Pastror Belga	2	B	4	Rojo	90
	13	Pastror Belga	2	R	1.5	BL	90
	14	Pastror Belga	3	B	4	BL	80
IA con semen fresco	15	Bulldog Inglés	2	E	2.2	BL	90
	16	Bulldog Inglés	2	B	3	BL	95
	17	Bulldog Inglés	3	B	1.8	BL	90
	18	Bulldog Inglés	4	B	2.5	BL	90
	19	Bulldog Inglés	2	B	1.5	BL	80
	20	Bulldog Inglés	2	E	2.2	BL	80
	21	Bulldog Inglés	2	B	3	BL	85
	22	Bulldog Inglés	4	B	1.8	BL	80
	23	Welsh corgi	3	E	1	BL	60
	24	Bulldog inglés	2	B	2	BL	80
	25	Bulldog inglés	2	B	2	BL	80
	26	Labrador	3	B	3	BL	80
	27	Bulldog Inglés	3	B	1	BL	90
	28	Bulldog Inglés	5	B	2	BL	90

Claudicación y baja consistencia testicular; *Criptórquido bilateral; § pseudohermafrodita y dolor perianal

N: número de individuo.

AEP: Anomalías espermáticas primarias

AES: Anomalías espermáticas secundarias

Vol: volumen espermiático

SRD: sin raza definida

E: Excelente

B: Bueno

R: regular

M: malo

BL: Blanco lechoso

NA: No aplica

EAR: Evaluación de aptitud reproductiva

IA: Inseminación artificial

Fuente: Este estudio

Un macho adulto sin raza definida (Cuadro 7, individuo 6) mostró alteraciones en sus genitales externos. El paciente fue rescatado de la calle, presentaba glande sin prepucio y una especie de vagina distal al recto a través de la cual orinaba (Figura 4), lo que causaba erosión en la piel del escroto. El animal fue esterilizado quirúrgicamente.



Figura 4. Macho adulto pseudohermafrodita con historial clínico desconocido. (A) Glande del pene, prepucio incompleto, vista ventrodorsal y vista lateral (B). (C) Testículos. (D) Orificio vulvar. Fuente: Lab. Reproducción Canina, México, DF. 2015.

Según Feldman y Nelson (2007), dentro de las anomalías del sexo fenotípico se encuentran los pseudohermafroditas masculinos, los cuales poseen cromosoma Y, pueden presentar testículos y tienen genitales con grado variable de feminización, así como grados variables de malformación peneana y/o escrotal.

Durante la evaluación del libido, los machos mostraron una respuesta positiva a la estimulación con hembra en celo o ante materiales con secreciones vulvares de hembras en celo, evidenciando interés, olfateo, excitación, erección y eyaculación. La falta de interés en los perros puede ser influida por agresividad de los machos o estrés a la examinación.

Además, el exceso de ruido, presencia de muchas personas, exposición a un ambiente desconocido, aunado a una técnica deficiente para la colecta, como exceso o falta de presión, suelen ser causas del fracaso de la recolecta seminal (Feldman y Nelson, 2007).

Para la evaluación del semen se colectó la primera y segunda fracción del eyaculado, el cual en el perro consta de tres fracciones: la primera fracción es la prostática, con un volumen aproximado de 0.5 a 2 ml que se emite durante los primeros segundos o minutos; la segunda fracción es la espermática que procede del epidídimo, con un volumen aproximado de 0.5 a 2 ml y una duración de segundos a dos minutos; y la tercera fracción que procede de la próstata, que puede alcanzar un volumen de cinco a 30 ml y tardar hasta 30 minutos (Páramo, 2008; Root, 2010).

El color normal del eyaculado es blanco lechoso. Se obtuvieron un total de tres muestras de semen rojizo, provenientes de un Whippet y de dos individuos colectados por estudiantes (Cuadro 7, individuos 2,10 y 13).

La presencia de sangre puede deberse a desgaste del macho por múltiples intentos de monta, hiperplasia prostática benigna, neoplasias testiculares o lesiones ocurridas en el glande del pene durante la colecta (Gradil et al., 2006), razón por la cual es de suma importancia coleccionar el semen evitando lacerar el pene. El pH, solo se evaluó en ocho perros, y osciló entre seis y siete, lo que se considera normal (Páramo, 2008).

La motilidad espermática fue evaluada en todos los casos, tanto al momento de la colecta, como antes de realizar las IA (Cuadro 6 y 7). En semen fresco se observó una motilidad que osciló entre 60% y 95%, mientras que en semen descongelado la motilidad estuvo entre 65% y 80%.

Esta diferencia es esperable, la cual usualmente se debe a los efectos dañinos de los procesos de congelamiento y descongelamiento sobre los espermatozoides (Silva et al., 2005; England y Millar, 2008). Algunos autores consideran que la motilidad progresiva mínima de un eyaculado apto para la reproducción debe ser igual o superior a 70% (Páramo, 2008; Kim et al., 2010), y superior al 80% en eyaculados destinados a congelamiento (Reyes, 2000; Herrera et al., 2008).

No obstante, es importante tener presente que hay otras variables de gran importancia que influyen, tales como concentración y morfología. En la pasantía se empleó semen con motilidades de 60% en adelante en las inseminaciones de semen fresco y descongelado, resultando en preñeces exitosas (Cuadro 7, individuo 23).

La evaluación morfológica del semen fue realizada únicamente en siete animales, con resultados aceptables en seis de los individuos (máximo de 5% de anomalías espermáticas primarias, 10% de secundarias y mortalidad espermática menor a 5%).

Como se observa en el cuadro 7, el macho Bulldog Inglés de diez meses de edad (Individuo 1), fue el que presentó un mayor porcentaje (23%) de anomalías espermáticas primarias como las colas enrolladas (Figura 5A), y secundarias (10%) como gota citoplasmática distal (Figura 5B).

En el resto de las evaluaciones se presentó una mortalidad espermática no mayor al 5% y anomalías secundarias que no sobrepasaron los rangos normales, dentro de las que se observaron cabezas sueltas (Figura 5C) y colas dobladas. Debe resaltarse que la manipulación de la muestra al momento de la elaboración del frotis puede generar falsas alteraciones en los

espermatozoides sobre todo a nivel de cola (Feldman y Nelson, 2007; Páramo, 2015), lo que debe ser tomado en cuenta en las muestras que se realizaron con fines de docencia.



Figura 5. Anomalías espermáticas. Tinción de eosina-nigrosina. Aumento 40X. A) Colas enrolladas (anomalía primaria). B) Gotas citoplasmáticas distales en cuatro espermatozoides (anomalía secundaria). C) Cabeza y cola suelta. Fuente: Lab. de Reproducción. Canina, UNAM. México, DF. 2015.

La evaluación morfológica de los espermatozoides no debe ser obviada en ninguna valoración reproductiva, ya que evidencia la funcionalidad de las gónadas y tiene relación directa con la fertilidad del semental. Además, el proceso de formación y maduración de los espermatozoides puede verse afectado por eventos tales como enfermedad, cambios de temperatura, empleo de medicamentos, desbalances en la nutrición.

Asimismo, es importante tener presente que la duración del proceso de espermatogénesis de un canino tiene una duración de 62 días, por lo que en el momento en que se observan cambios en el eyaculado, suelen ser reflejo de eventos que sucedieron semanas atrás. Por ende, en los machos utilizados como reproductores es importante realizar varias evaluaciones andrológicas a lo largo del año (Feldman y Nelson, 2007; Kim et al., 2010).

Las anormalidades espermáticas primarias corresponden a alteraciones en el proceso de formación espermática (espermatogénesis), mientras que las anormalidades espermáticas

secundarias se originan durante el proceso de maduración (Kim et al., 2010; Fontbonne, 2011, Páramo, 2015).

Dentro de los factores que afectan las características del semen se encuentra la pubertad (Feldman y Nelson, 2007), por lo que la cantidad de espermatozoides anormales y muertos puede verse aumentada en los primeros eyaculados, en cuyo caso se recomienda la revaloración en 60 días.

Existen otras causas asociadas a la presentación de este problema, dentro de las que se encuentran procesos inflamatorios, neoplásicos, o congénitos (Kutzler, 2011). En este caso para el Bulldog Inglés de diez meses (Cuadro 6, individuo 1), se recomendó una evaluación al menos dos a cuatro meses después.

La concentración espermática fue evaluada en ocho machos, dos de los cuales se remitieron para evaluación de aptitud reproductiva y seis destinados a congelamiento del semen, de los cuales tres fueron con fines didácticos (Cuadro 7, individuos 2, 3 y 4). La concentración máxima obtenida fue de 1.5×10^9 /ml, en un paciente Bulldog Inglés de tres años, destinado para congelamiento de semen.

Dos pacientes resultaron azoospermicos, entre ellos un criptórquido bilateral, lo cual es un hallazgo esperado para esta condición (Cuadro 7, individuo 7) (Wiebe y Howard., 2009); así como el macho Whippet (Cuadro 7, individuo 1), al cual se recomendó la reevaluación en dos meses, para descartar que los hallazgos hayan sido alterados por las múltiples montas insatisfactorias realizadas al permanecer con la hembra en celo por un tiempo prolongado. A pesar de esta resolución, es claro que la disminución en la consistencia testicular y la

presentación de azoospermia, es altamente indicativa de que este macho no debió de haber sido considerado apto para reproducción.

El resto de los pacientes fue calificado en una forma subjetiva con una concentración excelente, buena, regular o mala; evaluada junto con la motilidad espermática, ya que los propietarios no desearon realizar examen seminal, o por razones de practicidad en animales previamente evaluados.

La concentración normal de espermatozoides en caninos por mililitro se encuentra entre los 1×10^8 a 2×10^8 espermatozoides, siendo aproximadamente de 2×10^8 a 2×10^9 espermatozoides totales por eyaculado (Sánchez et al., 2006; Restrepo et al, 2009; Páramo, 2015). Partiendo del hecho de que la concentración espermática se define como el número de espermatozoides por unidad de volumen, esta característica no debe ser evaluada de manera subjetiva, tal como fue realizada en la mayoría de casos estudiados en la presente pasantía.

3.6 Dilución, refrigeración y congelamiento de semen

Se refrigeró semen en dos ocasiones durante prácticas estudiantiles, ya que para las fertilizaciones solo se empleó semen congelado o fresco. Las diluciones se realizaron con leche descremada con el objetivo de extender el volumen total de los eyaculados sin afectar la viabilidad de los espermatozoides.

La caseína presente en la leche es la principal responsable de proporcionar un efecto de protección a los espermatozoides, previniendo la unión de los mismos a las proteínas del

plasma seminal y reduciendo la pérdida de lípidos, ayudando a mantener la motilidad y viabilidad de los espermatozoides a 4°C (Sánchez et al., 2006; Baran et al., 2012).

La técnica de refrigeración de semen tiene el fin de condicionar una mejor tasa metabólica de los espermatozoides para extender su viabilidad por dos a tres días, permitiendo el transporte del mismo a temperatura de 4°C. La contaminación bacteriana puede prevenirse mediante la adición de antibióticos como penicilina o gentamicina (Sánchez et al., 2006; Stornelli y De la Sota, 2006; Baran et al., 2012).

Asimismo, la leche es un recurso barato y de fácil acceso, que podría facilitar enormemente la realización de procesos de enfriamiento y transporte de semen en caninos, con fines de mejoramiento reproductivo, por lo que llama la atención que esta práctica no se realizara con mayor frecuencia, ya que podría incidir en una menor tasa de cirugías con fines de inseminación con semen congelado.

Durante la estancia, se realizaron seis congelamientos de semen mediante el uso de un diluyente casero a base de Lactosa-yema de huevo y glicerol. Tres congelamientos se llevaron a cabo con fines didácticos y tres fueron empleados para la reservación del semen para posteriores inseminaciones por motivos de distancia geográfica, los cuales presentaron motilidad progresiva mínima del 70% luego de adicionar el glicerol.

El congelamiento de semen permite conservar el eyaculado a temperaturas de -196°C, por tiempo prolongado, romper con barreras geográficas, brinda la oportunidad de fertilizar varias hembras con un mismo eyaculado; lo cual es un manejo de vital importancia especialmente en criaderos para evitar el desgaste de los machos y por último, permite conservar semen de machos que posteriormente por razones de enfermedad o muerte no puedan ser

colectados (Páramo, 2005; Root, 2010). No obstante, requiere de equipo y personal capacitado (Páramo, 2005; Root, 2010).

Aunado a esto, el sometimiento del eyaculado a un proceso de congelación disminuye su viabilidad por lo que únicamente eyaculados de buena calidad (motilidad mayor a 70%, concentración mayor a 2×10^8 espermatozoides por ml, sin presencia de eritrocitos, ni de altos porcentajes de anormalidades espermáticas) son aptos para soportar un proceso de congelamiento con éxito (Root, 2010).

El glicerol empleado posee un efecto crioprotector, modificando la permeabilidad de la membrana, disminuyendo así la pérdida de volumen y el estrés osmótico, así como la prevención de la formación de cristales de hielo intracelulares (Restrepo et al., 2009; Holt y Penfold, 2014).

La yema de huevo también posee un efecto crioprotector, protege la movilidad de los espermatozoides y previene la capacitación prematura de los mismos (Restrepo et al., 2009; Kim et al., 2012). Por otro lado, la lactosa, previene la formación de hielo intracelular (Stornelli y De la Sota, 2006).

En cuanto a la adición de antibióticos, se han empleado gentamicina, tilosina, lincomicina-espectinomicina, penicilina, estreptomycin y la amikacina. En las preparaciones realizadas únicamente se empleó la penicilina (Penisodina® 400 000 UI), a una dosis aproximada de 0.006 g.

La adición gradual del glicerol en concentraciones crecientes, a intervalos de 30 minutos, se utilizó con el fin de evitar el estrés osmótico en los espermatozoides. No obstante, en estudios realizados por Silva y colaboradores (2003), se comprobó que a diferencia de otras especies, no

se percibe diferencia alguna entre la dilución única o fraccionada del semen canino con glicerol, siendo incluso más práctico, realizarla como una única dilución.

En la actualidad existen diluyentes formulados para el congelamiento del semen, como CaniPRO® chill 5, o chill 10; los cuales al ser sometidos a distintas pruebas y controles de calidad, disminuyen el riesgo de errores y tiempo de empleo, si se compara con un diluyente que es preparado con cada proceso de congelamiento (Anditecnica, 2016). No obstante se considera interesante conocer la preparación de un diluyente, que les ha generado resultados favorables a lo largo de los años en las clínicas visitadas.

Tomando en cuenta que el sometimiento del eyaculado a procesos de refrigeración y congelamiento, disminuye la calidad del mismo notablemente, se considera que para la obtención de resultados exitosos es indispensable la evaluación andrológica del macho, donde se verifique que el semen a emplear cuenta con las características óptimas: motilidad mayor al 80%, concentración espermática mayor a 2×10^8 espermatozoides por eyaculado, un porcentaje no mayor al 5% de espermatozoides muertos y 20% como máximo de anomalías espermáticas (Stornelli y De la Sota, 2006).

5. CONCLUSIONES

- 5.1. La aplicación y la integración de técnicas tales como la citología vaginal y la determinación de los niveles de progesterona, son idóneas con el fin de determinar el momento ideal para llevar a cabo la inseminación artificial en la perra.
- 5.2. La evaluación andrológica en el canino es indispensable para conocer su capacidad reproductiva. Aspectos como la determinación por métodos objetivos de la concentración espermática y porcentaje de anomalías espermáticas en el semen, son indispensables, tanto para determinar el potencial reproductivo del semental, como para conocer aspectos como el grado de dilución del eyaculado, número de dosis que se pueden procesar, y conocer el número de espermatozoides viables por pajilla previo a su utilización en programas de reproducción canina asistida.
- 5.3. Se concluye que el procedimiento de congelamiento del semen mediante el uso del diluyente lactosa-yema de huevo y glicerol, empleado en el congelamiento de semen en seis individuos durante la pasantía, es un procedimiento económico, accesible y eficaz. Sin embargo, es importante tener presente la existencia de diluyentes y crioprotectores comerciales especialmente destinados para perros, que facilitan enormemente la realización de estos procesos, y evitan la probabilidad de errores y variables que puedan surgir durante su empleo.
- 5.4. Se evidenció la importancia de la determinación previa de los niveles de P_4 en 30 hembras, con el fin de determinar cursos de acción para incrementar las tasas de

preñez, determinado si se utilizaba inseminación artificial por vía intravaginal o intrauterina.

5.5. Se comprobó la utilidad de la ecografía para el diagnóstico de preñez, en 38 oportunidades, la cual permitió verificar el éxito reproductivo y la viabilidad de los fetos, como la prevención y atención de partos distócicos, incrementando la expectativa de vida de los cachorros y la madre.

6. RECOMENDACIONES

Dentro de las recomendaciones realizadas para las Clínicas de Reproducción Canina de la UNAM y Sanatorio Animal se encuentran: realizar una mayor integración de la condición clínica y reproductiva de los pacientes, especialmente cuando se tratan patologías reproductivas que tienen implicaciones a nivel sistémico.

Mejorar los expedientes y registros de los pacientes integrando todos los procedimientos realizados, diagnósticos de preñez, tratamientos administrados, con el fin de facilitar el seguimiento de la condición de cada paciente y obtener mayor retroalimentación de los resultados de las técnicas realizadas.

Implementar el método de inseminación trans cervical mediante endoscopía en la perra dado que es un método menos invasivo y con el cual se obtienen resultados similares a la inseminación intrauterina por laparotomía. Eso evitaría el sometimiento de las pacientes a un procedimiento quirúrgico, el cual posee un riesgo alto e innecesario.

En la actualidad, existen diluyentes para congelamiento de semen, preparado y estandarizado, los cuales disminuyen el riesgo de errores durante su procesamiento, reducen el tiempo invertido y facilitan el empleo de la técnica de congelamiento, los cuales pueden integrarse, para mejorar el servicio reproductivo.

Se recomienda realizar una evaluación andrológica a todos los machos, previa a su utilización para fines de inseminación artificial. La evaluación de la concentración seminal debe realizarse por medio de métodos objetivos como lo son su determinación con cámara de conteo, ya que es la única forma de conocer la cantidad de espermatozoides que se están empleando

para la inseminación, así como para determinar el grado de dilución y cantidad de diluyente que puede ser agregada a dicho eyaculado, sin afectar su calidad post descongelamiento.

El manejo médico reproductivo debe enfocarse, no solo en el mejoramiento de la capacidad reproductiva de los animales sino que debe considerar además, criterios de salud animal y la posibilidad de transmisión de características indeseables. Por tanto, el seguimiento reproductivo debe ser realizado en forma ética, cuidadosa y rigurosa, velando por el bienestar animal.

Se recomienda incentivar al propietario a la realización de evaluaciones andrológicas periódicas, las cuales permiten tener un mayor control sobre los resultados de fertilidad obtenidos, así como el reconocimiento de cambios en la capacidad reproductiva de los machos destinados a reproducción.

Para nuestro país, se recomienda fomentar la preparación de médicos veterinarios para que realicen una mayor implementación de técnicas de manejo reproductivo, máxime si se toma en consideración que muchas de ellas son accesibles, sencillas, que no requieren necesariamente de un equipo costoso.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDITECNICA (Andina de Tecnologías). 2016. Dilución de semen. [en línea]. Andina de Tecnologías. Medellín, Colombia. <http://www.anditecnica.com/biotecnologia-reproductiva-/canino/dilucion-de-semen.html>. (Consulta 04 feb. 2016).
- Aralla, M., D. Groppetti, L. Caldarini, F. Cremonesi, & S. Arrighi. 2013. Morphological evaluation of the placenta and fetal membranes during canine pregnancy from early implantation to term. *Res. Vet. Sci.* 95: 15-22.
- Baran, A., O. Ozdas, S. Sandal, & K. Ak. 2012. Effects of skim milk and tris extender on frozen-thawed canine sperm morphology. *J. Anim. Vet. Adv.* 11: 3242-3246.
- Baştan, A., D. Baki, & M. Cengiz. 2008. Uterine and ovarian metastasis of transmissible venereal tumor in a bitch. *turk. J. Vet. Anim. Sci.* 32: 65-66.
- Connor, C. & A. Traas. 2009. Advanced canine reproductive techniques: the most current approaches in breeding management. *J. Vet. Behav.* 8: 256-257.
- Davidson, A. & E. Feldman. 2010. Ovarian and estrous cycle abnormalities. p: 1883-1889. *In* Ettinger, S. & E. Feldman. (eds). *Textbook of veterinary internal medicine*. 7. ed. Elsevier, Saunders, Canada.
- Diagnóstica Comercial. 2013. IMMULITE ® 1000. [en línea]. Diagnóstica Comercial S.A. Sinaloa, México. (Consulta: 15 abr. 2015).
- England, G. & K. Millar. 2008. The ethics and role of IA with fresh and frozen semen in dogs. *Reprod. Dom. Anim.* 43: 165-171.

- England, G. & A. Von Heimendahl. 2010. BSAVA manual of canine and feline reproduction and neonatology. 2. Ed. British Small Animal Veterinary Association, England.
- Farrell, L., J. Schoenebeck, P. Wiener, D. Clements, & K. Summers. 2015. The challenges of pedigree dog health: approaches to combating inherited disease. *Canine Genetics and Epidemiology*. 2: 2-14.
- Feldman, E. & R. Nelson. 2007. *Canine and feline endocrinology and reproduction*. 3. ed. Elsevier, United States of America.
- Fontbonne. A. 2011. Infertility in male dogs: recent advances. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 35: 266-273.
- Gil, E., D. Garcia, A. Giannico, & T. Froes. 2014. Canine fetal rate: do accelerations or descelerations predict the parturition day in bitches? *Theriogenology* 82: 933-941.
- Goericke, S., B. Schmidt, K. Failing, & A. Wehrend. 2010. Changes in the histomorphology of the canine cervix through the oestrous cycle. *Theriogenology* 74: 1075-1081.
- Gradil, C., A. Yeager, & P. Concannon. 2006. Evaluación de los problemas reproductivos del macho canino. *Recent Advances in Small Animal Reproduction*, New York, USA.
- Groppetti, D., A. Pecile, C. Barbero, & P. Martino. 2012. Vaginal Bacterial Flora and cytology in proestrous bitches: Role on fertility. *Theriogenology* 77: 1549-1556.
- Herrera, E., L. Castro & J. Chacón. 2008. Evaluación del efecto del glicerol en el congelamiento del semen canino. *Cienc. Vet.* 26: 7-20.

- Johnston, S., M. Root, & P. Olson. 2001. Canine and feline theriogenology. Elsevier, Saunders, United States of America.
- Kim, S., Y. Do & K. Yong. 2010. Effects of cryopreservation on phosphatidylserine translocation of intracellular hydrogen peroxide, and DNA integrity in canine sperm. *Theriogenology*. 73: 282-292.
- Kong, I., D. Yu, S. Jeong, I. Oh., C. Yang, S. Cho, I. Bae., D. Oh, H. Kim., S.K. Cho & C. Park. 2003. A New device for intrauterine Artificial Insemination in the Dog. *Asian-Aust. J. Anim.Sci.* 16: 180-184.
- Kowalewsky, M. 2014. Luteal regression vs prepartum luteolysis: Regulatory mechanisms governing canine corpus luteum function. *Reproductive Biology*. 14: 89-102.
- Kutzler, M. 2011. Canine semen collection and management of male fertility. Oregon State University, Oregon, United States of America.
- Manosalva, I., C. Cortés., V. Leyva., M. Valdivia., M. De los Reyes.,C. Barros. & R. Moreno. 2005. Efecto de la refrigeración sobre la motilidad, integridad acrosomal, y reacción acrosomal en espermatozoides caninos. *Rev. Inv. Perú.* 16: 114-128.
- Martí, S. 2011. *Reproduction y neonatología canina y felina*. Grupo Asís Biomédica. Navarra, España.
- Mateus, L., & B. Eilts. 2010. Cystic endometrial hiperplasia and pyometra. p. 1676-1680. *In* Ettinger, S., & E. Feldman. (eds). *Textbook of veterinary internal medicine*. 7. ed. Elsevier, Canada.

- Mattoon, J., & T. Nyland. 2015. Ovaries and uterus. p. 634-653. *In* Mattoon, J., & T. Nyland. (ed). Small animal diagnostic ultrasound. 3. ed. Elsevier, Canada.
- Moxon, R., D. Copley, & G. England. 2010. Quality assurance of canine vaginal cytology: a preliminary study. *Theriogenology* 74: 479-485.
- Páramo, R., & J. Balcázar. 2005. Manual de prácticas en manejo reproductivo de perros. Departamento de Reproducción de la Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Páramo, R. 2008. Caninos. p. 487-514. *In* Galina, C. (ed). Reproducción de animales domésticos. 3. ed. Limusa, Balderas, México.
- Páramo, R. 2015. Taller de reproducción canina: memorias. Departamento de Reproducción de la Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Pereira, S., C. Malm, M. Henry, L. Telles, M. Silva, F. Bono, M. Machado, G. de Oliveira, M. Silva, R. Marques, M. de Albuquerque, & V. Arabicano. 2012. Endoscopic transcervical intrauterine artificial insemination in Labrador Retriever bitches. *Research in Veterinary Science*. 92: 494-500.
- Prinosilova, P., & V. Kopecka. 2012. Cryopreservation of canine sperm contaminated with blood. 7th International Symposium on Canine and Feline Reproduction. Whistler, Canada.
- Payan, R., S. Miranda., & W. Nizańsky. 2011. Artificial insemination in dogs. [en línea]. Manafi. M. InTech. Rijeka, Croatia. <http://www.intechopen.com/books/artificial-insemination-in-farm-animals/artificial-insemination-in-dogs> (Consulta: jul. 2015).

- Reglamento para la reproducción y tenencia responsable de animales de compañía. 2004. Diario Oficial La Gaceta, Costa Rica. N°. 26: 2-5. Feb. 6.
- Reichler, I. & E. Michel. 2009. Dystocia: recognition and management. *In* Davies, K (ed). EJCAP. 19: 165-174.
- Restrepo, G., N. Vásquez, & E. García. 2009. Criopreservación de semen canino y su aplicación en la inseminación artificial. *Rev. CES.* 4: 119-129.
- Reyes, M. 2000. Bancos de semen canino para inseminación artificial. [en línea] TecnoVet. N° 3. Universidad de Chile. Santiago, Chile. http://web.uchile.cl/vignette/tecnovet/CDA/tecnovet_articulo/0,1409,SCID%253D11544%2526ISID%253D464,00.html. (Consulta: 06 feb. 2016).
- Rijsselaere, T., A. Van Soom., D. Maes., S. Verberckmoes., & A. De Kruif. 2004. Effect of blood as mixture on in vitro survival of chilled and frozen-thawed canine spermatozoa. *Theriogenology* 61: 1589-1602.
- Root, M. 2010. Clinical canine and feline reproduction: evidence-based answers. Wiley-Blackwell, Iowa, United States of America.
- Root, M. 2014. Applied small animal andrology. p. 177-187. *In* Chenoweth, P., & S. Lorton. (ed). *Andrology: theories and applications.* CAB. International. London, United Kingdom.
- Sánchez, A., A. Cartagena, & M. Bernald. 2006. Comparación del efecto de los diluyentes sobre la fertilidad potencial de semen canino refrigerado. *Rev. Investing. Vet. Perú.* 17: 01-07.

- Senger, P. 2005. Pathways to pregnancy and parturition. 2. ed. Cadmus Professional Communications, United States of America.
- Silva, A., R. Cardoso, D. Uchoa, & L. Silva. 2003. Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. *Theriogenology*. 59: 821-829.
- Silva, A., R. Cardoso, & L. Silva. 2005. Comparison between different dilution rates on canine semen freezing using Tris-buffer with addition of egg-yolk and glycerol. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 57: 764-771.
- Stornelli, M. A., M.C. Stornelli, M. Arauz, & L. De la Sota. 2001. Inseminación artificial con semen fresco, refrigerado y congelado. Aplicación y desarrollo en caninos. *Analecta Veterinaria* 21: 58-66.
- Stornelli, M., & R. de la Sota. 2006. Fertilidad y supervivencia del semen canino criopreservado. *Analecta Veterinaria* 25: 29-38.
- Thomassen, R., & W. Farstad. 2009. Artificial insemination in canids: a useful tool in breeding and conservation. *Theriogenology* 72: 190-199.
- Walters, E. 2007. Comparative reproductive physiology of domestic animals. p. 117. *In* Shatten, H., & G. Constantinescu. (ed). *Comparative reproductive biology*. Blackwell Publishing, Iowa, United States of America.
- Wayne, R. & C. Vila. 2001. Phylogeny and origin of the domestic dog. p. 1-11- *In* Ruvinsky, A. & J. Sampson. (ed) *The genetics of the dog*. London, United Kingdom.

Wiebe, V., & J. Howard. 2009. Pharmacologic advances in canine and feline reproduction.

Topics in Companion Animal Medicine 24: 71-98.

Wydooghe, E., E. Bergmans, T. Rijsselaere & A. Van Soom. 2013. International breeder

inquiry into the reproduction of the English bulldog. Vlaams Diergeneeskunding

Tijdschrift. 82: 38-43.

8. ANEXOS

Anexo 1. Constancia de término de pasantía



Of. No. FMVZ/COEPA/g/01/15
ASUNTO: Término de Estancia

A QUIEN CORRESPONDA.

Se hace constar que **MELISSA MARIA QUESADA SEGURA** llevó a cabo su estancia de manera satisfactoria en el Departamento de Reproducción de esta facultad, bajo la supervisión de la Dra. Rosa María Paramo Ramírez, en un horario de 9:00 a 14:00 horas y en el Sanatorio Animal bajo la supervisión de la Dra. Brenda Salgado Esparza, en un horario de 15:00 a 22:00 horas, todos los días del periodo comprendido del 2 de marzo al 8 de mayo del presente año.

Agradeciendo de antemano su atención, quedo a sus órdenes para cualquier aclaración.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Ciudad Universitaria, D. F., mayo 6 del 2015.

EL COORDINADOR

DR. JAVIER FLORES COVARRUBIAS



Anexo 2. Constancia de participación en el Taller 16 de Reproducción Canina de la Universidad Nacional Autónoma de México.



Anexo 3. Constancia de participación en la conferencia de “Nutrición y alimentación del cachorro” impartida en la Universidad Nacional Autónoma de México.



Anexo 4. Método para toma de muestra y tinción de Diffquick[®] de CVE.



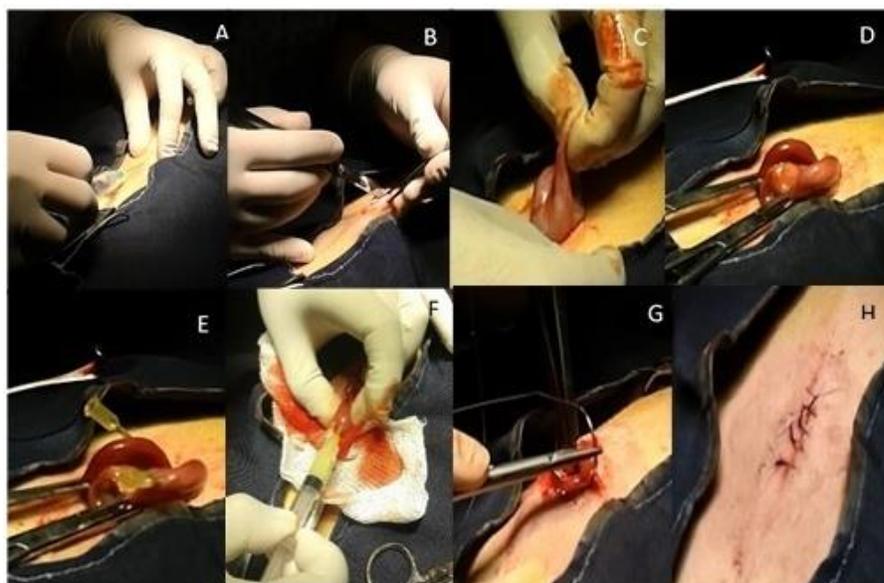
A) Humedecer una torunda de algodón con agua y limpiar los labios y la comisura vaginal. B) Se verifica que el algodón del hisopo estéril esté bien adherido y se introduce en forma vertical y horizontal en la vagina de la hembra realizando tres exfoliaciones en forma circular. C) Rodar el hisopo por el portaobjetos formando tres líneas. D) Fijación en metanol o alcohol 70% y secado al aire. E) Introducir la lámina 15 veces o por 15 minutos en el Hemocolorante 1 (tinción con eosina) F) Introducir la lámina 15 veces o por 15 minutos en el Hemocolorante 2 (tinción con un tinte de tiazina). G) Lavado de lámina. H) Secar al aire. Fuente: Clínica Sanatorio Animal. México, DF. 2015.

Anexo 5. Procedimiento para inseminación artificial intravaginal (IAIV) con semen fresco.



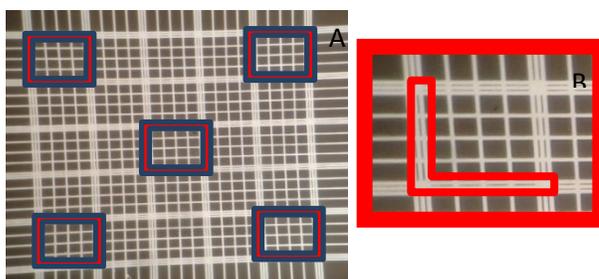
A) Exposición de entrada de la vagina posterior a la limpieza. B) Introducción de pipeta en forma vertical. C) Avance de la pipeta en posición horizontal. D) Depósito del semen. E) Introducción de aire. F) Elevación de tren posterior por 2 minutos y masaje vulvar. Fuente: Clínica Sanatorio Animal. México, DF. 2015.

Anexo 6. Técnica inseminación artificial intrauterina por laparotomía.



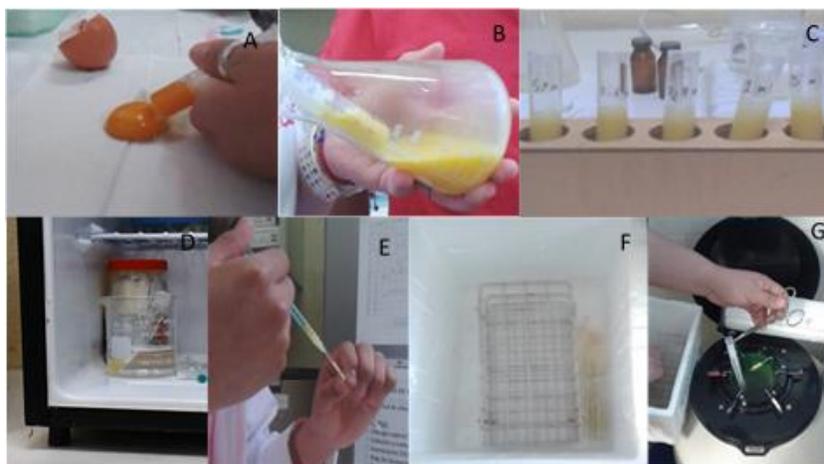
A) Administración de lidocaína en línea media. B) Incisión en línea media. C) Exposición y revisión de cuernos uterinos. D) Sujeción de cuernos uterinos con pinzas Allis. E) Cateterización de cuernos uterinos. F) Depósito de semen en cada cuerno uterino. G) Sutura de capa muscular. H) Sutura de piel. Fuente: Clínica Sanatorio Animal. México, DF. 2015.

Anexo 7. Contabilización de espermatozoides en la Cámara de Newbauer.



A) Conteo de las 4 esquinas y el centro de la cámara, se suman ambas cámaras se promedia y el resultado se divide entre 5. B) Para el conteo de espermatozoides se toman en cuenta solo los espermatozoides presentes a partir de la línea media e interna de los ejes izquierdo e inferior. Fuente: Lab. Reproducción Canina, UNAM. México, DF. 2015.

Anexo 8 Congelamiento de semen



A) Extracción de yema de huevo. B) Preparación de diluyente. C) Diluyente con cinco concentraciones de glicerol. D) Refrigeración semen. E) Llenado de pajillas. F) Introducción a nitrógeno líquido. G) Introducción a tanque de nitrógeno. Fuente: Lab. Reproducción Canina, UNAM. México, DF. 2015.

Anexo 9. Ejemplo del seguimiento del ciclo estral en 4 hembras (2 Bulldog Inglés, 1 Rottweiler, 1 Setter Irlandés), de un total de 140 hembras estudiadas para fines de fertilización mediante inseminación artificial.

Paciente (raza)	Fecha de muestreo	Hallazgos de CVE	P ₄ (ng/ml)	Etapas del ciclo estral	Procedimiento
Celeste (Bulldog Inglés)	02/03/2015	Células superficiales y Anucleadas en un 90%.	0.2	Proestro-Estro	
	05/03/2015	Células superficiales y Anucleadas en un 90%.	0.4	Proestro-estro	
	09/03/2015	No se realizó	6*	Estro	
	11/03/2015	No se realizó	20.1	Estro	IAIU con semen congelado
Toska (Bulldog Inglés)	03/03/2015	Células superficiales y Anucleadas en un 90%.	0.4	Proestro	
	07/03/2015	No se realizó	0.9	Proestro-Estro	
	11/03/2015	No se realizó	6.4*	Estro	
	13/03/2015	No se realizó	15.1	Estro	IAIU con semen fresco
Kelly (Rottweiler)	12/03/2015	Células superficiales y Anucleadas en un 90%.	0.2	Proestro-Estro	
	15/03/2015	No se realizó	0.4	Proestro-Estro	
	19/03/2015	No se realizó	2.0	Estro	
	20/03/2015	No se realizó	4*	Estro	
	24/03/2015	No se realizó	14	Estro	IAIU con semen fresco
Kiss (Setter Irlandés)	16/04/2015	Parabasales e intermedias 70%, Superficiales y Anucleadas en un 30%.	0.2	Proestro-estro	
	21/04/2015	Células superficiales y Anucleadas en un 90%. Eritrocitos +++	1.6	Estro	
	24/04/2015	No se realizó	4.2*	Estro	
	02/05/2015	No se realizó	13		IAIV con semen fresco
	04/05/2015	Parabasales e intermedias en un 90%.		Diestro	

(*) Momento estimado de la ovulación. CVE: citología vaginal exfoliativa P₄: progesterona sérica. IAIV: inseminación artificial intravaginal, IAIU: inseminación artificial intrauterina.

Fuente: Clínica Sanatorio Animal, México, D.F. 2015.