

*Trabajos de Revisión***INSEMINACIÓN ARTIFICIAL CON SEMEN FRESCO, REFRIGERADO Y CONGELADO. APLICACIÓN Y DESARROLLO EN CANINOS****M.A. Stornelli^{1,2}, M.C. Stornelli¹, M.S. Arauz², L. De La Sota¹.**¹ Cátedra de Reproducción Animal. ² Servicio Central de Laboratorio.

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. Sin embargo, si los factores mencionados no son adecuadamente controlados puede tornarse una práctica desalentadora. La aplicación de IA con semen criopreservado aumentará las posibilidades de desarrollo del profesional veterinario en nuestro país.

Palabras claves: Inseminación artificial caninos- semen refrigerado- semen congelado

ARTIFICIAL INSEMINATION WITH FRESH, CHILLED AND FROZEN SEMEN. APPLICATION AND DEVELOPMENT IN CANINE.

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, the pregnancy resulted could be very encouraging. However if those factors are not properly controlled the results obtained could be very discouraging. The use of artificial insemination with frozen semen will increase the professional development of the veterinarians in our country.

Key words: Artificial insemination-dog- chilled semen-frozen semen

Fecha de recepción: 05/03/01

Fecha de aprobación: 27/08/01

Dirección para correspondencia: Alejandra Stornelli, CC 296, (B1900AVW) La Plata, ARGENTINA.**E-mail:** *astornel@fcv.medvet.unlp.edu.ar*

INTRODUCCIÓN

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. 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 (1). Fue en 1956 que Harrop logra la primer preñez con semen refrigerado (2) abriendo las puertas a la criopreservación. Posteriormente, en 1969, se comunica por primera vez una IA satisfactoria con semen congelado (3).

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) 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.

El objetivo de este trabajo fue analizar los factores que condicionan el éxito de la IA y la posibilidad de realizarla con semen criopreservado en nuestro país.

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:

- 1) Estado de salud y nutrición de los reproductores.
- 2) Detección del momento de mayor fertilidad de la hembra.
- 3) Tipo, manejo y calidad del semen utilizado.
- 4) 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 afeción 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 (4). 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 luminales 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 (5). El estudio de extendidos vaginales seriados desde el comienzo del proestro nos permitirá, junto con la imagen vaginoscópica, aproximar el comienzo del estro (6,7). Sin embargo no podremos 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 de LH es el método más exacto para identificar el pico de LH. Sin embargo, debido al costo, este método no se utiliza rutinariamente (8).

Si estimamos el día en que ocurre el pico preovulatorio de LH, dos días más tarde ocurrirá la ovulación de oocitos primarios, los cuales madurarán en aproximadamente 48 horas (8, 9, 10). 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 (11).

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 (12, 13, 14). Sin embargo se han comunicado preñeces con 20 x 10⁶ de 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 (15, 16).

La significación de las alteraciones morfológicas de los espermatozoides es otro parámetro muy poco estudiado. Algunos autores han comu-

nicado que los defectos espermáticos primarios y secundarios no deben exceder el 30 o 40 % (17, 18). 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 (19).

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 (20). En el semen congelado la motilidad espermática luego del descongelado es el mejor indicador de fertilidad (19).

La adición de Royal Jelly a diluyentes con Equex STM paste parece tener efectos sinérgicos en la viabilidad espermática al descongelado (21). 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 (22). 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 (11, 23, 24).

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 nuestro país la IA con semen fresco se realiza ocasionalmente, no utilizándose en la práctica reproductiva diaria la IA con semen refrigerado y/o congelado. 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 más 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 en nuestro país. Sin embargo, el trabajo realizado en el área indica que en un futuro cercano estará disponible en la Argentina la posibilidad de acceder a bancos de semen congelado.

IA 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 (11, 23, 24, 25).

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 % (23). Por otra parte implementando IA con semen fresco se obtuvo un porcentaje de preñez de 83,8 % (19).

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 (26). 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 (20).

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.

IA 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 (27). Los diluyentes protegen a las membranas del espermato-

zoide del daño causado por los cambios de temperatura, proveen energía y mantienen estables el pH y la osmolalidad (28, 29). Los antibióticos agregados a los diluyentes evitan la proliferación bacteriana, en especial en los que contienen yema de huevo (30).

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 (12, 13). Algunas experiencias realizadas *in vitro* encuentran mejor conservación del semen en TYH (30, 31). 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 % (24). 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 (31, 32).

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 %) (25).

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 (14, 25).

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.

IA 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 (12, 13, 19, 33, 34). Sin embargo 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 (11, 35, 36).

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 (13, 34).

La mayoría de los autores logran mejores resultados utilizando inseminación intrauterina (mediante laparotomía, laparoscopia o cateterismo cervical) para el uso de semen congelado (24, 37). Los porcentajes de preñez obtenidos con el uso de inseminación intrauterina varían entre 60% y 90 % (14, 16, 35, 37, 38). 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 I).

Por otra parte, la técnica de inseminación intrauterina utilizada varía con la disponibilidad de material, equipos y entrenamiento de cada especialista (24, 37, 38). 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 (39). 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 (38, 40, 41), 4,8 mediante la aplicación de IA intrauterina quirúrgica (40) y 4,6 IA vaginal (42). 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 (43, 44, 45, 46).

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 (43). 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 (15). En el perro se estima que 200 X 10⁶ espermatozoides viables al descongelado son necesarios para obtener tasas aceptables de preñez (5).

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 descongela-

do 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 espermatozoides 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 esper-

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

Table I. Bitch pregnant rate in artificial insemination with frozen semen

Autor	Volumen de pajueta	Técnica de IA	Porcentaje de preñez	tamaño promedio de la camada
Silva 1996	0,5 ml	IAUL	60	SD
Nothling 1997	0,25 ml	IAV	100	9
Nothling 1993	0,25 ml	IAVCFP	92,9/100	9.3
	frac. prost	IAVSFP	60	10.7
Fastard 1984	0,5 ml	IAUT	64-69	SD
Fosberg 1995	0,5 ml	IAV	40-80	4
		IAUN	83-91	5.4
Fontbone 1993	0,5 ml	IAV	52,6	4.2
		IAUT	73,6	5.5
Wilson 1993	0,5 ml	IAUT	80	5

inseminación artificial vaginal: IAV; inseminación artificial vaginal con fracción prostática: IAVCFP; inseminación artificial vaginal sin fracción prostática: IAVSFP; inseminación artificial uterina laparoscópica: IAUL ; inseminación artificial uterina cateter noruego: IAUN; inseminación artificial uterina transcervical: IAUT; no se informa el dato en el trabajo de referencia: SD

matozoides necesitaremos para lograr la fertilización (44). 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 (43).

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 (16, 24, 37), aunque algunos autores obtienen buenos resultados con IA intravaginal (38).

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. Luego el catéter es retirado y la hembra es mantenida 10 a 15 minutos con el tren posterior sobreelevado (26).

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 (29).

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).

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 (24).

La cateterización del cuello puede realizarse visualizando el cérvix con ayuda de un endoscopio (16). 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.

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. Es una práctica sencilla pero el número de inseminaciones es limitado y deben extremarse las medidas para evitar infecciones (14, 47). También puede realizarse mediante laparoscopia, técnica utilizada rutinariamente en ginecología humana. Sin embargo, el costo de los equipos hace que esta técnica halla sido utilizada sólo ocasionalmente (48).

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 sobrevivencia 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 intrauteri-

nas sencillas (IA quirúrgica) que no requieren más entrenamiento que el necesario para realizar una ovariectomía, práctica de rutina en el ejercicio profesional.

BIBLIOGRAFÍA

1. Spallanzani L. *Observatione e esperienze in torno ai vercimelli spermatici del' uomo e degli animali. Opuscoli di fisica animale e vegetatile opuscolo. II. Modena. 1776.*
2. Harrop AE. Mating natural service and artificial insemination in reproduction in the dog. Ed., Tindall & Cox. London (England), 1960; p.87-99.
3. Seager SWJ. Successful pregnancies utilizing frozen dog semen. *AI Digest* 1969; 17:6-7.
4. Fastard W. Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology*. 2000; 53:175-186.
5. Johnston DJ, Kuztritz MVR, Olson P. Canine and feline theriogenology. Ed. Saunders. Philadelphia (United States), 2001; 16:287-306.
6. 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.
7. Fosberg CL. Accurate monitoring of the estrus cycle of the bitch for artificial insemination. *Proceedings 19th World Congress of the WASAVA*. 1994; p.601-605.
8. Concannon PW, Hansen W, Visek WJ. The ovarian cycle of the bitch: plasma estrogen, LH and progesterone. *Biol. Reprod*. 1975; 13:112-121.
9. 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.
10. Concannon PW. A review for breeding management and artificial insemination with chilled or frozen semen. *Proceedings of canine reproduction Symposium*. September 1997. American college of theriogenologist. 1997; p.1-17.
11. 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; 39:299-310.
12. Morrow DA. *Current Therapy in theriogenology: Diagnosis, Treatment and Prevention of Reproductive Disease in Animals*. Ed. Saunders. Philadelphia (United States). 1980; p.661-665.
13. Kirk RW. *Current Veterinary Therapy X: Small Animal Practice*. Ed. Saunders. Philadelphia (United States). 1989; p.1247-1259.
14. Dumond C, Fontbonne A. *Les indispensables de l' animaux de compagnie*. Ed P.M.C.A.C. Paris (Francia), 1993; p.153-159.
15. 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.
16. Wilson M. Non surgical intrauterine artificial insemination in bitches using frozen semen. *J Reprod Fertil*. 1993; 47:307-311.
17. Feldman EC, Nelson RW. *Canine and feline endocrinology and reproduction*. Ed Saunders. Philadelphia (United States), 1987; p.481-524.
18. Oetlé EE. Sperm morphology and fertility in the dog. *J Reprod Fertil*. 1993; 47:257-260.
19. Morton DB, Bruce SG. Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs. *J Reprod Fertil*. 1989; 39:311-316.
20. Johnston SD. Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital. *Vet. Clin. North. Am*. 1991; 21 (3):545-551.
21. 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.
22. 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.
23. England GCW, Allen WE. Seminal characteristics and fertility in dogs. *Vet Rec* 1989; 125:399.
24. Fosberg CL. Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. *Vet Clin North Am* 1991; 21:467-485.
25. 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.
26. Ettinger SJ, Feldman ER. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. Ed. Saunders Philadelphia (United States), 1995; p.1664-1662
27. 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.
28. Lardy HA, Philips PH. Preservation of spermatozoa. *Proc Am Soc Anim Prod*. 32 ND Ann Meet 1939; p.219-231.
29. Marshall F, Hugh A. Reproduction in the male in Marshall's physiology of reproduction. Ed Churchill Livingstone. New York (United States), 1990; p.769-775
30. Rota A, Strom B, Fosberg CL. Effects of seminal plasma and three extender on canine semen stored at 4°C. *Theriogenology* 1995; 44:885-900.
31. 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.

A. Stornelli y col.

32. 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; p.165.
33. England GCW. Criopreservation of dog semen: A review. *J Reprod Fertil.* 1993; 47:243-255.
34. Smith FO. Update on freezing canine semen, in Kirk RW (ed) *Current veterinary therapy IX.* Ed Saunders Philadelphia (United States), 1986; p.1243-1248.
35. Nothling JO, Volkman DH. Semen quality after thawing: correlation with fertility and fresh semen quality in dogs. *J Reprod Fertil.* 1997; 51:109-116.
36. Dobrinski I, Lulai C, Barth AD, Post K. Effects of four extenders and three different freezing rates on post-thaw viability of dog semen. *J Reprod Fertil.* 1993; 47:291-296.
37. Silva LDM, Onclin K, Lejeune B, Vestergen JP. Comparison of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen. *Vet Rec.* 1996; p.154-157.
38. 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.
39. 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.
40. 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.
41. 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.
42. Nötling 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.
43. Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci.* 2000; 60:481-492
44. Salamon S, Maxwell WMC. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci.* 2000; 62:77-111.
45. 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.
46. 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.
47. Held JP. Critical evaluation of the success and role of chilled and frozen semen in today's veterinary practice. *Proceedings of canine reproduction Symposium.* September 1997. American college of theriogenologist 1997; p.49-59.
- 48 Wildt DE. Laparoscopy, in Burke T. J. *Small Animal Reproduction and infertility.* Ed. Lea & Febiger. Philadelphia (United States), 1986; p.121-140.