

Frotis vaginales e inseminación artificial en la perra

C. Dumon

Palabras Clave: Frotis vaginales; Inseminación artificial, Perra.

Correspondencia:
Clínica Veterinaria Saint-Roch,
10, Rue Saint-Roch,
78200 Mantes-la-Jolie,
Francia

Resumen. En el presente trabajo se describe la técnica de realización de frotis vaginales en la perra, sus indicaciones y su interpretación. Así mismo, se discuten el método y la utilidad de la inseminación artificial en la perra.

Abstracts

In this paper, the method and applications of vaginal smears in the bitch are described. In the second part of the article the different techniques for artificial insemination and their advantages and disadvantages are discussed.

Key Words: Vaginal smears; Artificial insemination; Bitch.

Introducción

Todavía se solicitan más los servicios del veterinario especialista en animales de compañía para evitar que para favorecer la reproducción de las perras y de las gatas. Sin embargo, la infertilidad canina toma cada día mayor importancia en nuestras consultas, con el valor creciente de los perros de pura raza, el desarrollo de la cinofilia y de los criadores aficionados o profesionales.

Una hembra valiosa que rehúsa la monta o que es estéril tras el acoplamiento es una decepción para el criador, un motivo de consulta cada vez más frecuente, e incumbe al veterinario adquirir los conocimientos necesarios para determinar las causas y si es posible remediarlas.

Además, junto a estas demandas formuladas directamente, en muchas ocasiones un interrogatorio profundo y adecuado con ocasión de una visita rutinaria de una perra, nos revelará que no ha estado en celo desde hace tiempo, tal vez que sus celos son muy irregulares o bien que se la había intentado hacer criar y había rechazado la monta.

Nota del director de la revista: Agradecemos al Dr. Antoni Prats, de la clínica veterinaria Rocaberti (Barcelona) la traducción de este artículo del francés al español.

Hay, por tanto, en lo que respecta a la infertilidad canina, consultas formuladas directamente y consultas "provocables" en propietarios que no sospechaban que una intervención de su veterinario era capaz de solucionar su problema.

La infertilidad canina puede derivar de múltiples etiologías, pero estadísticamente el rechazo de la monta o la mala sincronización ovulación-monta, representan la mayoría -el 80% aproximadamente- de los fallos de la reproducción en esta especie.

Si bien la inseminación artificial resuelve los rechazos de la monta, no se verá coronada por el éxito más que si se efectúa en el buen momento y la realización de frotis vaginales es, actualmente, la mejor manera de determinar ese "buen momento".

Así pues, frotis vaginales e inseminación artificial canina, que son dos temas interdependientes incluso si el interés de la citología vaginal no se limita a la inseminación y si, otros medios -algunos de ellos muy prometedores-, están actualmente a la disposición del clínico para determinar el momento de la ovulación en la perra.

Para un desarrollo más didáctico estudiaremos sucesivamente:

Frotis vaginales: realización, interpretación, aplicaciones.

Inseminación artificial: la cual, en la perra, puede ser realizada con semen fresco ("ayuda a la monta") o con semen congelado.

A. Frotis vaginales

El celo de la perra es el testimonio de una fisiología sexual con manifestaciones cíclicas y las células observadas en el frotis vaginal son el reflejo de todas estas variaciones, del funcionamiento y del estado de su aparato genital.

Examinaremos sucesivamente la realización, la interpretación y las aplicaciones de esta prueba.

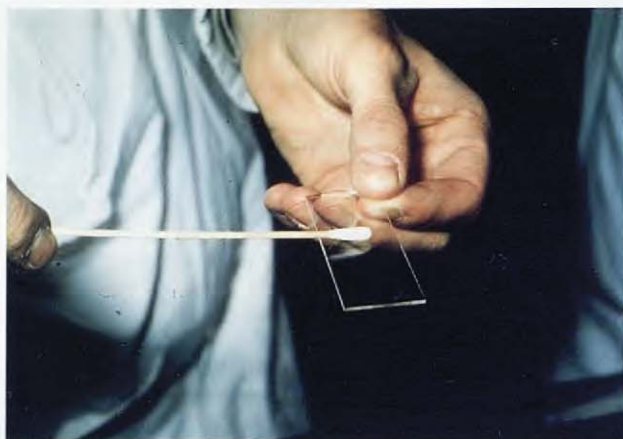


Fig. 1. Preparación del frotis.



Fig. 2. Células epiteliales vaginales descamadas teñidas con azul de metileno.



Fig. 3. Células epiteliales y hematíes teñidos con el método de May Grünwald-Giemsa.



Fig. 4. Batería de colorantes para la tinción de Harris-Schorr.

Realización

1. Toma de la muestra

Se utiliza un escobillón estéril, largo, como mínimo de 15 cm, humedecido con una gota de suero fisiológico (el agua destilada o el agua del grifo, alteran las células).

Esta pieza debe introducirse a lo largo del borde superior de los labios vulvares, a fin de evitar la fosa del clítoris (movimiento que se realiza con el escobillón vertical).

Inmediatamente, se la hace bascular hacia la horizontal y penetrar delicadamente lo más profundamente posible.

Tras algunos movimientos de rotación, se retira lentamente hacia atrás.

2. Extensión (Fig. 1)

Es conveniente entonces hacer rotar el algodón sobre el portaobjetos y sobre todo, nunca frotar, para no alterar las células. No volver a pasar dos veces por el mismo sitio. Esta extensión debe realizarse inmediatamente,

tras la toma de muestra para evitar la desecación.

3. Fijación

El portaobjetos se sumerge inmediatamente, durante cinco minutos, en una mezcla alcohol-éter (AA), que realiza la fijación de la muestra.

El frotis así fijado se puede conservar 15 días antes de ser teñido.

4. Tinción

Pueden efectuarse tres tinciones:

a) Tinción monocromática al azul de metileno (Fig. 2).

No permite poner en evidencia las afinidades de coloración de las células vaginales y, por tanto, la interpretación del frotis se basa en su forma y en la visualización de su núcleo.

b) Tinción de May Grünwald Giemsa (Fig. 3).

Tiene la ventaja de su rapidez (menos de un minuto), y de poner muy bien en evidencia leucocitos y hematíes, pero la diferenciación de las células vaginales se basa

Tabla I. Tinción de Harris-Schorr

<p>Sacar la extensión del fijador y teñirla inmediatamente.</p> <p>Alcohol de 70°: sumergir 10 veces. Alcohol de 50°: sumergir 10 veces. Agua destilada: sumergir 10 veces. Hematoxilina de Harris: 2 minutos. Agua destilada: un pase. Agua destilada: un pase. Alcohol amoniacoal: 1 minuto. Agua destilada: un pase. Alcohol de 70°: pase. Alcohol de 95°: pase. Colorante de Schorr: 2 minutos. Alcohol de 95°: pase. Alcohol de 100°: pase.</p> <p>Secar y observar al microscopio.</p>
--



Fig. 6. Frotis vaginal de una perra en el inicio del proestro. Tinción de Harris-Schorr

exclusivamente en los mismos criterios, de forma y de visualización de los núcleos, que la tinción precedente.

c) Tinción de Harris Schorr (Fig. 4. Tabla I).

Es la tinción preferible. Claro que son necesarios 15 minutos para su realización, pero las células vaginales se diferencian perfectamente por afinidades de coloración que facilitan la lectura de manera considerable.

Interpretación

Deben tenerse en cuenta tres elementos principales en la lectura de un frotis vaginal:

- Presencia de hematíes o de leucocitos.
- Forma de las células, presencia o ausencia de núcleo y forma del núcleo, caso de existir.
- Afinidad de coloración del citoplasma de estas células (azul basófilo, amarillo-anaranjado = acidófilo).

1. Las células vaginales.

Pueden observarse tres tipos de células vaginales:

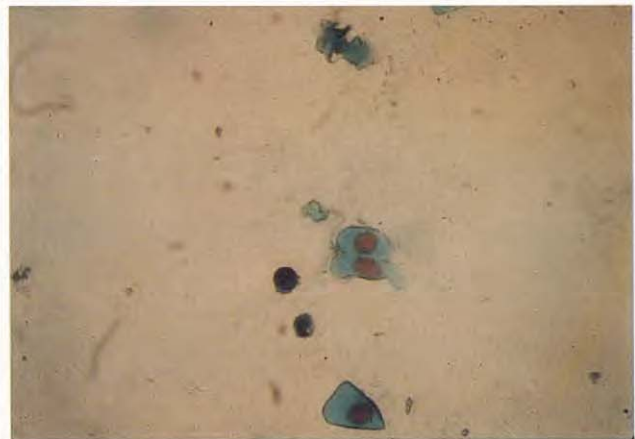


Fig. 5. Frotis vaginal de una perra en anoestro. Tinción de Harris-Schorr

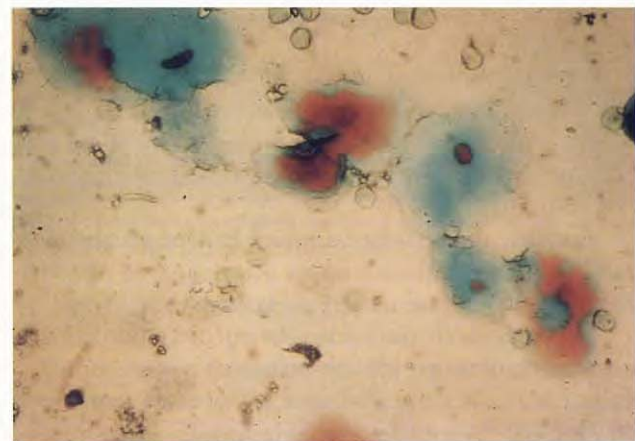


Fig. 7. Frotis vaginal de una perra en mitad del proestro. Tinción de Harris-Schorr.

a) Células parabasales

- Diámetro pequeño.
- De forma redonda y oval.
- Núcleo grande.
- Coloración basófila.

b) Células intermedias

- Contornos irregulares.
- Núcleos bien visibles.
- Coloración basófila y/o acidófila (según el momento de obtención de la muestra).

c) Células superficiales

- Contornos irregulares.
- Núcleo picnótico o ausente.
- Coloración acidófila (en ocasiones basófila al principio).

2. Ciclo sexual y frotis vaginal

Según la fase del ciclo sexual en la que se obtenga la muestra, el examen microscópico del frotis será muy

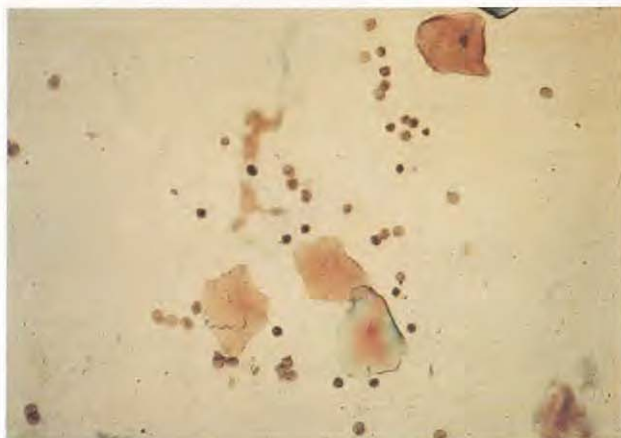


Fig. 8. Frotis vaginal de una perra en el final del proestro. Tinción de Harris-Schorr.

diferente. La interpretación confirmará o desmentirá los síntomas clínicos y la anamnesis.

a) Anoestro (Fig. 5)

- Frotis pobre en células.
- Ningún hematíe, algunos leucocitos.
- Las células vaginales son células parabasales basófilas, pequeñas, de núcleo grande, a menudo agrupadas "en columnas".

Esta fase, de duración variable (2 a 8 meses, según las razas o los individuos), no se acompaña de síntomas exteriores: es la fase de reposo sexual.

La presencia de numerosos leucocitos en un frotis de anoestro indica una infección vaginal o uterina.

b) Proestro

• Desde el principio del proestro (Fig. 6), clínicamente caracterizado por la aparición de un edema vulvar y de pérdidas de sangre, pueden observarse:

- Mayor número de células.
- Esencialmente células intermedias y algunas células superficiales, con núcleo picnótico. Coloración basófila.
- Hematíes muy numerosos, sin leucocitos.

• A mitad del proestro (Fig. 7)

- El número de células vaginales aumenta aún más.
- Disminuye el número de células intermedias, aumenta el número de células superficiales. El núcleo es picnótico, la coloración basófila y/o acidófila.
- Abundantes hematíes, sin leucocitos.

• Al final del proestro (Fig. 8)

- Casi exclusivamente, células superficiales, de núcleo picnótico o anucleadas, coloración esencialmente acidófila.
- Disminución del número de hematíes, sin leucocitos.

Está cercano el momento de la ovulación. Conviene realizar inmediatamente una primera monta/inseminación. Según las perras, el proestro evoluciona en 5-10 días.

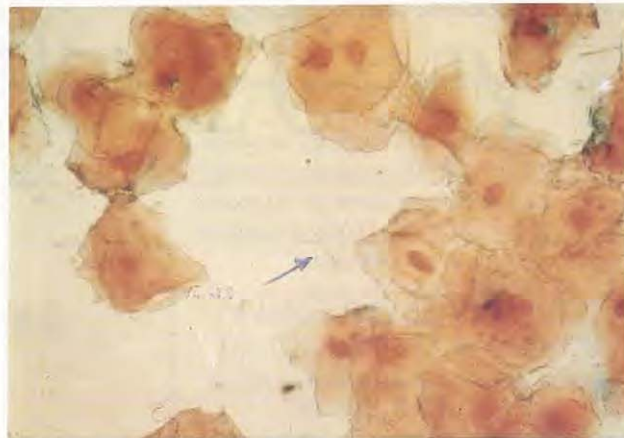


Fig. 9. Frotis vaginal de una perra en el estro. Tinción de Harris-Schorr.

c) Estro (Fig. 9)

Sobreviene entonces el estro:

- Las células vaginales son extremadamente numerosas.

-Se trata de células superficiales queratinizadas, de coloración acidófila y anucleadas, presentándose en racimos.

-No quedan prácticamente hematíes. Sin leucocitos.

Es el momento de la ovulación, teóricamente de la aceptación y de la búsqueda del macho y tras dos días de observación de un frotis de estas características -que se podrá observar durante 5-10 días-, hay que practicar una nueva monta o inseminación.

d) Metaestro (Figs. 10-11)

El frotis se modifica de manera brusca:

-Aparición brutal de células parabasales, basófilas, ovales o redondeadas, y con un gran núcleo, junto a células intermedias.

-Estas células poco numerosas, a menudo unidas a glóbulos blancos, ocuparán progresivamente todo el campo microscópico.

-No hay glóbulos rojos.

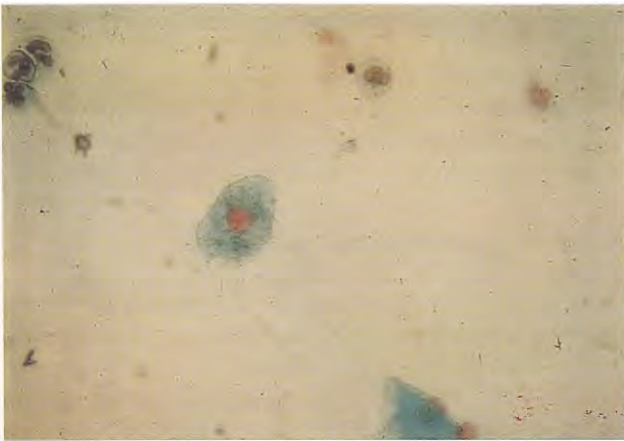
Es el período de nidación o de pseudogestación, que durará de 60 a 120 días, según las perras.

Comentarios

1. Momento preciso de la ovulación

La ovulación se localiza en el momento del estro, pero los frotis permanecen idénticos varios días y si el clínico no ha seguido la evolución del frotis desde el inicio del proestro, no puede determinar con precisión que el acoplamiento o la monta inmediatamente preconizadas hayan ocurrido en el momento adecuado, no siendo fecundable el óvulo más que durante 48 horas.

Por el contrario, en cuanto se ve aparecer la primera célula parabasal de metaestro, se puede afirmar -desgraciadamente *a posteriori*- que la ovulación ha tenido lugar



Figs. 10-11. Frotis vaginal de una perra en el metaestro. Tinción de Harris-Schorr.

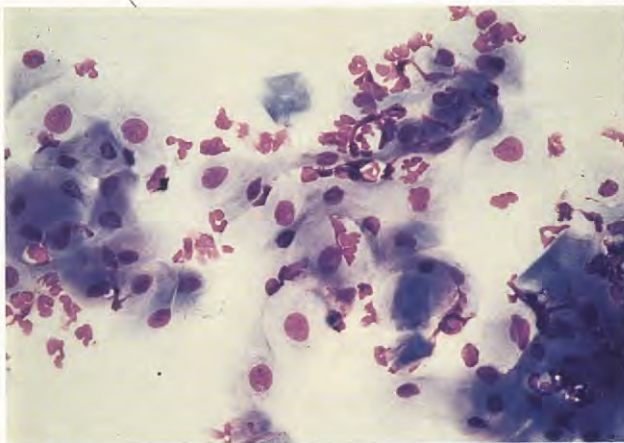
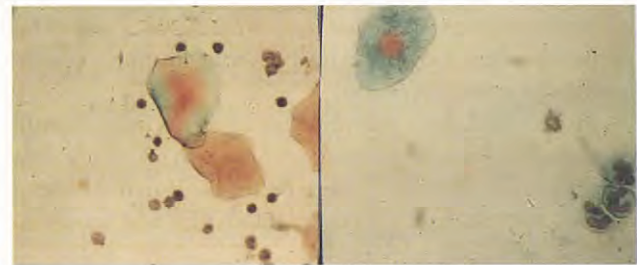


Fig. 12. Frotis vaginal de una perra con una infección uterina. Tinción de May Grünwald Giemsa.



Figs. 13 y 14. Frotis vaginal de una perra en el final del estro y en el metaestro, respectivamente. Tinción de Harris-Schorr.

seis días antes.

Esta idea fundamental demuestra la necesidad de seguir la evolución de los frotis desde el inicio del celo para optimizar las posibilidades de éxito de la reproducción.

Ello permite, a la vez, *a posteriori*, informar al propietario que se ha actuado a tiempo o demasiado tarde.

Además, estas informaciones son muy importantes para los celos próximos.

En efecto, sí hay variaciones de una perra a otra, pero una perra ovula siempre el mismo día de sus celos.

2. Índice acidófilo

$$\text{Este índice (IA} = \frac{\text{número de células acidófilas}}{\text{número de células basófilas}} \text{)}$$

es máximo, es decir, superior a 0,5, en el momento de la ovulación. Desciende por debajo de 0,1 a los 4 o 5 días, tras un coito (o una inseminación) fecundante.

Si no ha habido fecundación, habrá que esperar tres semanas para que alcance estos valores.

Este concepto puede ser puesto en práctica de manera provechosa como elemento de diagnóstico precoz de gestación.

3. Infección uterina (Fig. 12)

Una imagen de metaestro que se acompañe de un gran número de leucocitos, indica una afección vaginal o un proceso uterino (metritis, piometra).

4. Una posible confusión: fin de proestro/inicio de metaestro (Figs. 13-14)

Al final del proestro, las pequeñas células intermedias todavía basófilas y nucleadas, pueden confundirse con células parabasales de metaestro en lo que hace referencia a medida y coloración. La diferenciación debe establecerse por los contornos angulados y los núcleos pequeños de las células intermedias, a diferencia de los contornos redondeados y de los grandes núcleos de las células parabasales. Finalmente, y sobre todo, las células sanguíneas confirman el diagnóstico (hematíes = proestro, leucocitos = metaestro).

Aplicaciones

1. Elección del momento óptimo para la monta o la inseminación

Esta es sin duda la principal aplicación de los frotis vaginales:

-Monta prácticamente segura.

- Economía del macho.
- Economía de desplazamientos inútiles, si los reproductores son de zonas alejadas.
- Economía de pajuelas (inseminación con espermatozoides congelado).

Efectivamente, si bien estadísticamente la ovulación ocurre entre el 10º y el 14º día del celo (80% de casos), ello no es siempre así. Una de cada cinco perras se sale de esta regla general y debe sumarse también a ello el error siempre posible del propietario respecto al verdadero inicio del celo.

Son precisamente estas reproductoras "fuera de lo normal", las que dan problemas y justifican una consulta con el veterinario.

Hay que saber que determinadas perras aceptan al macho en el inicio de su período de fecundidad, limitado a los dos días de vida de los óvulos maduros, y que otras rechazan al macho que se les presenta, aunque teóricamente deberían aceptarlo.

Frotis vaginales e inseminación, son los métodos utilizados más corrientemente para ajustar la adaptación de los cinco días de vida en útero de los espermatozoides a los dos días durante los cuales los óvulos son fecundables.

2. Ciclos anovulatorios

-Determinados frotis, a pesar de ser seguidos regularmente desde el inicio del proestro, no evolucionan de la manera clásica.

-Es claramente posible observar un paso sin transición desde una mitad de proestro a un metaestro.

-Puede afirmarse entonces que no ha habido ovulación, y con ello se aporta la prueba concluyente -que podrá confirmarse con una tasa de progesteronemia- de una infecundidad por maduración folicular incompleta.

3. Control de la reproducción

a) Interrupción de la gestación

La terapia abortiva no está exenta de posibles riesgos en hembras reproductoras de gran valor; es más sensato en tales casos realizar un frotis vaginal, tras una monta indeseada. Si el día de la monta se observa una imagen de metaestro o de inicio de pro-estro, podemos desaconsejar una medicación inútil.

b) Prevención del celo (progestágenos) o a la inversa, desencadenamiento o provocación del celo (protocolos de estimulación)

Ninguna de las dos actuaciones debe aconsejarse fuera de la fase de anoestro. Asimismo es esta fase de anoestro la elegida para la ovariectomía para castración.

c) Confirmación de la monta (Fig. 9)

Algunas horas después del supuesto coito, pueden

observarse en el frotis la presencia de espermatozoides.

d) Presunción de gestación

Si el índice acidófilo es muy bajo al inicio del metaestro es posible confirmar, con mucha probabilidad, un diagnóstico precoz de gestación.

4. Patología del tracto genital (Fig. 12)

Los leucocitos abundantes, o la presencia de células anormales orientan hacia una infección o una lesión tumoral de la vagina o del útero.

Los frotis vaginales están indicados, de hecho, en toda investigación semiológica del aparato reproductor femenino.

Conclusión

Si bien el principal interés de los frotis vaginales radica en la determinación del momento de la ovulación, indispensable para la realización de la inseminación artificial, sus aplicaciones no se limitan a esta indicación, sino que deben significar un examen de rutina perfectamente dominado por el veterinario especializado en patología de los animales de compañía.

B. Inseminación artificial

La inseminación artificial, ampliamente utilizada en la cría de animales de abasto, se utiliza en estas especies normalmente a partir de semen congelado obtenido de progenitores selectos en una búsqueda de mejoras genéticas, de selección y de rentabilidad económica.

Dentro de la inseminación artificial canina, hemos de distinguir la inseminación artificial con semen fresco, muy utilizada y fácil de realizar, de la inseminación artificial a partir de semen congelado, mucho más difícil de llevar a la práctica que en las otras especies animales.

Consideraremos sucesivamente la inseminación artificial con semen fresco -que sería más adecuado calificar de "asistencia a la monta"- en sus indicaciones, su realización práctica y sus resultados, y luego trataremos de la inseminación artificial con espermatozoides congelado para mostrar sus particularidades, sus dificultades y sus perspectivas.

Inseminación artificial con semen fresco

1. Indicaciones

El problema planteado es muy simple: uno o dos criadores han decidido hacer criar una hembra con un semental, han esperado al 10º día del celo de la perra y es imposible el acoplamiento. ¿Por qué? Es esto, precisa-



Fig. 15. Neoplasia de vulva.



Fig. 16. Prolapso vaginal.



Fig. 17. Estenosis vaginal.

mente, lo que el veterinario tendrá que determinar, antes de aconsejar una "asistencia a la monta".

Existen dos razones esenciales:

- Incapacidad del macho.
- Rechazo de la hembra.

a) Incapacidad del macho

Con tres etiologías posibles a plantear:

- Inexperiencia del macho demasiado joven.
- Ausencia de libido en un macho demasiado viejo o bien inhibido por un modo de vida que lo ha mantenido siempre aislado de sus congéneres (razas enanas de apartamento).

-Afección genital o prostática.

b) Rechazo del acoplamiento por parte de la hembra

Generalmente, la hembra rehúsa el coito por tres motivos:

- Problemas físicos.
- Problemas psicológicos.
- Finalmente y sobre todo: momento inoportuno.

• Problemas físicos

El rechazo de la monta está motivado por:

- Lesiones vulvares o vaginales, que hacen imposible

o doloroso el acoplamiento: tumores (Fig. 15), prolapso vaginal (Fig. 16), vaginitis o vulvitis, eczema vulvar o perivulvar, estenosis vaginal (Fig. 17).

-Artrosis vertebral, que hace muy doloroso el cabalgamiento del macho (teckels, pequineses, etc.).

-Introducción de pelos que se intercalan entre el pene del macho y la vulva de la hembra, haciendo imposible la penetración (terriers, bobtails...). En ocasiones, es suficiente esquilmar la región vulvar para solucionar el problema.

• Problemas psíquicos

-Las perras agresivas entrenadas para guarda se lanzan sobre todo congénere que se les presenta, incluido el semental que se les ha escogido.

Por el contrario, las perras de apartamento, que han vivido siempre solas, se aterrorizan al ver a otro perro y se echan en cuanto el macho intenta la monta.

Las reproductoras que recuerdan un coito doloroso, pueden rechazar un nuevo acoplamiento.

Por último, conviene saber que las hembras de Saluki aceptan únicamente machos de su raza.

• Momento inoportuno

El origen más frecuente del rechazo a la cópula se encuentra sobre todo en la incorrecta sincronización monta/ovulación.

Por ello, el veterinario, ante todo, deberá dedicarse a determinar la correcta sincronización, el "buen momento".

2. Realización práctica

-La inseminación artificial con semen fresco debe realizarse en tres etapas:

-Asegurarse de que la perra está en el período óptimo de fecundidad.

-Obtener y controlar el esperma del semental.

-Inseminación propiamente dicha; es decir, introducción del esperma recogido en el tracto genital de la hembra.

a) ¿La perra está "a punto"?

Tras la ovulación, los óvulos sufren una maduración de dos días en las trompas del útero y luego son fecundables durante 48 horas.

Por su parte, los espermatozoides únicamente son fecundados durante 4 ó 5 días. Por ello es importante la precisión del momento de la ovulación.

En estos momentos hay tres métodos a disposición del veterinario:

-La realización de frotis vaginales, estudiada anteriormente.

-La medición de la resistividad del mucus vaginal

-La dosificación de la progesterona en sangre.

•Medición de la resistividad del mucus vaginal.

Fundamento: Se conecta una sonda, introducida en la vagina de una perra en celo, a un ohmetro para obtener valores de la resistividad del mucus vaginal, que se superponen a la curva en que figura el porcentaje de células vaginales queratinizadas (trabajo de Günzel, ver cuadro).

Asimismo, J. P. Mialot, ha demostrado que la curva de la resistividad del mucus vaginal sigue la maduración folicular y que su inflexión, que tiene lugar dos días después del pico de LH, indica la ovulación.

De hecho, los resultados obtenidos por esta medición no son en todas las perras tan precisos como harían suponer estas curvas-tipo. Sin embargo, se puede afirmar que no hay nunca ovulación mientras que la resistividad del mucus vaginal no sobrepasa los 800 ohm.

El principal interés de esta medición, tan simple como una toma de temperatura es, sobre todo, limitar el número de frotis vaginales, mucho más largos de hacer.

Conviene destacar que en el caso de la zorra, esta medición es muy precisa, y por ello se utiliza habitualmente en los criaderos de zorros para peletería de los países escandinavos.

•Dosificación de la progesterona en sangre

La dosificación de la progesteronemia permite precisar el momento de la ovulación.

Los valores normales de 1 ng/ml durante el anoestro se elevan entre 2 y 4 n/ml durante el proestro y el pico de LH, luego entre 4 y 10 ng/ml en el momento de la ovulación, y finalmente 15 a 80 ng/ml quince días, tras la ovulación.

El interés de esta determinación es triple:

-Confirma los otros métodos de investigación.

-Cualquier laboratorio puede realizarla en el mismo día, y muy probablemente, en un futuro próximo estarán a disposición de los clínicos kits de lectura rápida.

-Finalmente, y sobre todo, la elevación de la tasa sanguínea de progesterona es el testimonio más fiable de ovulación.

Una progesteronemia que no se ha "disparado" de su nivel base, permite afirmar que el ciclo ha sido anovulatorio.

Una progesteronemia superior a 15 ng/ml demuestra que, ciertamente, ha habido ovulación, pero que ya es demasiado tarde para inseminar.

b) Obtención y examen del espermatozoides del semental

Una vez considerada la hembra como "a punto", la segunda fase de la intervención consiste en obtener el espermatozoides del semental y en asegurarse de su calidad.

•Recogida del espermatozoides

La electro-eyaculación es inaplicable en el perro (dolor y destrucción de los espermatozoides); la vagina artificial empleada habitualmente en las demás especies, es inútil.

Un simple manguito de caucho o goma, terminado en un tubo plástico, puede constituir todo el material para la obtención.

Siempre es conveniente proteger el tubo de la luz y mantenerlo entre 37 y 40 °C (baño-maría). Por otra parte, el manguito no debe lavarse nunca con detergentes (efecto espermicida). La erección y la eyaculación se consiguen por masaje del pene encerrado en el manguito. La presencia de una perra en celo ("Teaser") facilita considerablemente las manipulaciones, aumenta el volumen del espermatozoides recogido y su concentración en

Tabla II. Diferentes fracciones del semen canino

	Aspecto	Obtención	Volumen	Concentración en espermatozoides
Fracción Uretral = Preesperma	Flemoso blanquinoso	30 a 50 segundos	0,2 a 2ml	<3,10 ⁶ espermatozoides/ml
Fracción Epididimaria = Esperma	Espeso acuoso	2 a 3 minutos	0,5 a 6 ml	400,10 ⁶ espermatozoides/ml
Fracción Prostática = Postesperma	Claro viscoso	5 a 7 minutos	3 a 30 ml	espermatozoides muy escasos
Eyaculado completo	Viscoso blanquinoso	7 a 10 minutos	4 a 35 ml	aproximadamente 400,10 ⁶ /ml



Fig. 18. Introducción del semen con jeringa de vidrio.

espermatozoides.

En el perro, la eyaculación es trifásica (Tabla II).

En el caso de asistencia a la monta, se utiliza todo el eyaculado. Cuando hablemos de semen congelado, veremos que únicamente se congelará la fracción epididimaria, rica en espermatozoides.

•Examen del espermatozoide

Una gota de espermatozoide colocada entre porta y cubreobjetos y observada al microscopio sin preparación, permite apreciar:

- La concentración en espermatozoides.
- Su movilidad, yendo desde la inmovilidad hasta verdaderas ondulaciones, simulando olas.

La adición de una gota de colorante Eosina-Nigrosina (Tabla III) permite precisar la proporción de espermatozoides muertos (teñidos de rosa) y vivos (que no se tiñen):

Pueden observarse también formas anormales y la presencia de leucocitos indicativos de la existencia de una afección del aparato urogenital del macho.

Este indispensable examen puede inducir al veterinario a rechazar el espermatozoide y solicitar otro semental.

En el caso hipotético -que se da con frecuencia- de que el propietario insista en mantener al animal que había escogido, se impone clarificar las dudas en cuanto al éxito de la intervención.

c) Inseminación propiamente dicha

Hay numerosos autores (Harrop, 1960; Andersen, 1969; Knauss, 1982; Farstad, 1984) que han descrito tasas bajas de fecundación por inseminación intra-vaginal y preconizado por el contrario la inseminación intra-uterina.

Por una parte el cateterismo del cuello del útero es difícil, incluso en período de celo, especialmente en las perras de razas enanas (orificio extremadamente pequeño) o gigantes (imposibilidad de inmovilizar el cuello del útero por palpación transabdominal). Si la perra es nerviosa, y no digamos si es agresiva, hay pocas posibilidades de éxito.



Fig. 19. Posición del animal después de la inseminación artificial.

Tabla III. Solución de Eosina-Nigrosina

Realizar en el siguiente orden:

1. Solución tampón de citrato
 - Diluir 3 g de citrato sódico en 100 ml de agua destilada
 - Añadir ácido cítrico hasta obtener un pH = 6,8
2. Nigrosina al 50%
 - Vertir 5 g de Nigrosina en 100 g de agua destilada
3. Eosina Nigrosina
 - Disolver 0,4 g de Eosina polvo en 50 cc del tampón y añadir 4 cc de Nigrosina al 5%

Por otra parte, en el coito en la perra, la inseminación es de tipo vaginal y la turgencia de los bulbos eréctiles y del glande del macho, impide el reflejo posterior del espermatozoide y estimula las contracciones vaginales, favoreciendo el desplazamiento de los espermatozoides en el útero.

Por todo ello, nos ha parecido que los malos resultados obtenidos con una simple jeringa de vidrio, incluso manteniendo levantado el tercio posterior de la hembra durante 10 minutos (Figs. 18-19), podían estar relacionados con una excesiva distorsión entre el montaje utilizado y las condiciones naturales del acoplamiento.

Esta es la razón por la que el profesor J. P. Mialot y yo mismo, hemos ideado un dispositivo, no traumatizante para la perra, fácil de manejar para el veterinario y que simula las condiciones fisiológicas del coito. Se trata de la pistola denominada Osiris por el fabricante (ref. brev. n.º 84-06-963).

•La pistola Osiris (Fig. 20)

Descripción. Sus principales características son las siguientes:

-El cuerpo blando de la pistola evita todo riesgo de traumatismo: su empleo no requiere la utilización del espéculo.

-El pequeño balón inflable situado en el extremo anterior de la sonda, debe evitar el reflujo del espermatozoide y

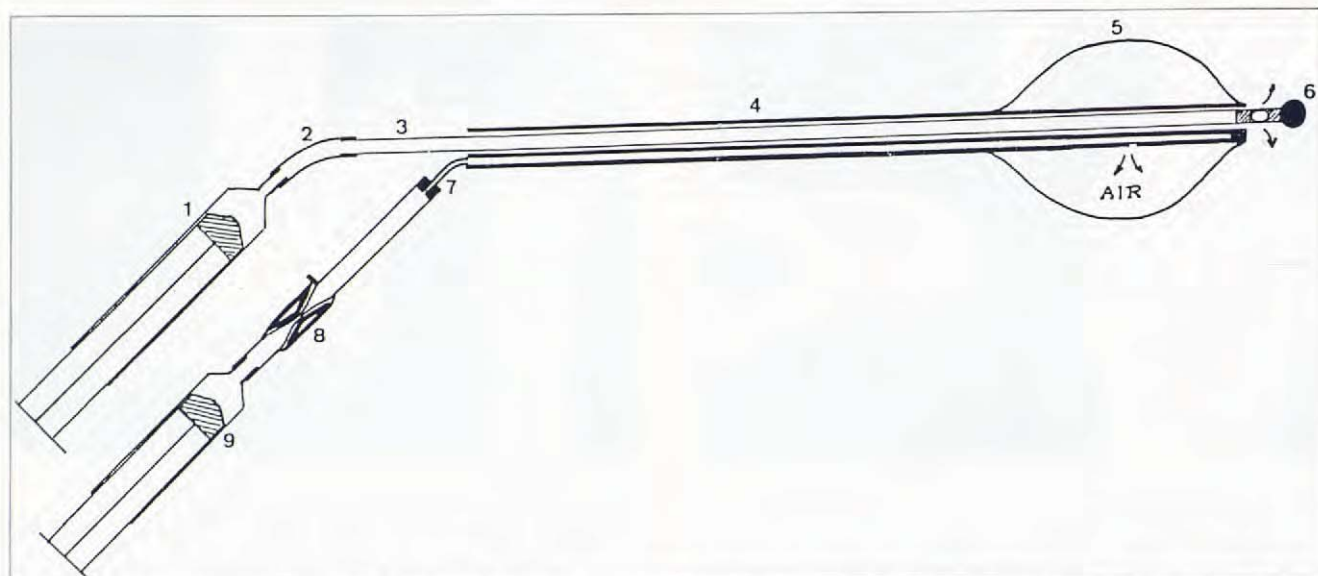


Fig. 20. Representación esquemática de la pistola de Osiris: 1. Jeringa conteniendo el esperma; 2. Adaptador blando; 3. Sonda balonada blanda (largo variable, pudiendo ser adaptada); 4. Cuerpo de la pistola blanda; 5. Pequeño balón inflable; 6. Bolita que evita el reflujo del semen hacia el cuerpo de la pistola; 7. Aguja; 8. Clamp; 9. Jeringa para inflar el balón.

simula la erección del perro (hinchamiento de los cuerpos cavernosos).

-La sonda telescópica terminada en una pequeña bolita, permite depositar el esperma contra el cuello del útero sin riesgo de traumatismo.

-Se trata de un dispositivo estéril de un solo uso, lo cual limita el riesgo de infección, tras diversas manipulaciones.

Colocación. El esperma controlado como de buena calidad, se aspira en una jeringa que, a su vez, se conecta a la sonda telescópica flexible. Se llena la sonda.

La pistola se introduce, sin espéculo, en la vagina hasta el cuello del útero. Se infla el balón y se cierra el conducto para evitar que se desinfe. Se empuja entonces la sonda hacia delante y se inyecta el esperma.

Deben insuflarse 1 ó 2 ml de aire, tras la manipulación, para evitar que quede esperma en la sonda. Finalmente, se retira la sonda hacia atrás y la bolita ocluye el orificio anterior, evitando así todo reflujo. La pistola se deja en su lugar 10 minutos, con el animal tranquilo y quieto, y no siendo necesario elevar el tercio posterior. Si se precisa, la pistola puede fijarse con una goma elástica a la base de la cola.

Retirada. Para retirar la pistola, basta con desinflar el balón y retirar lentamente el conjunto hacia la vulva.

Discusión. La pistola Osiris, empleada para la inseminación artificial con esperma fresco, presenta varias ventajas:

-Su flexibilidad evita los traumatismos, es bien tolerada por las perras, especialmente tras haberse inflado el balón, lo cual parece desencadenar contracciones vaginales.

-El balón limita el reflujo de esperma y parece facilitar el paso de los espermatozoides hacia el útero. Hemos comprobado que un volumen de 0,25 ml de producto de contraste inyectado durante el celo, aparece rápidamente (5 min.) en el interior del útero. Puede pensarse entonces que el balón evita el reflujo del esperma y además que las contracciones que provoca y la distensión de la región cervical serían, quizá, factores favorecedores del tránsito de los espermatozoides hacia el útero. Además, puede conseguirse limitar el volumen de esperma a utilizar en la inseminación, lo que sería de especial interés en la utilización del semen congelado.

Con todo ello, no parece necesario intentar pasar el cuello del útero para obtener buenos resultados, contrariamente a lo que se indica generalmente (Andersen, 1969; Farstad, 1984).

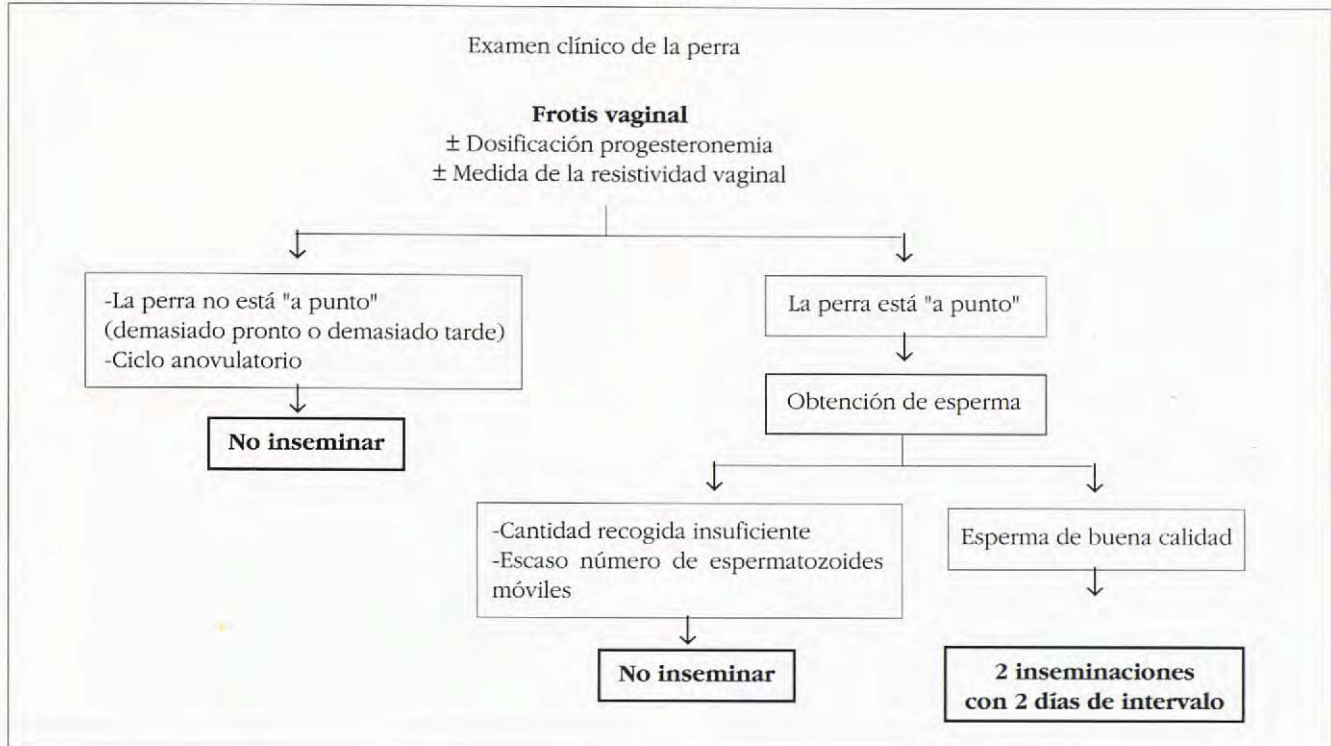
d) Resultados

Los resultados son excelentes cuando se respeta perfectamente el protocolo descrito y cuando el único motivo que ha aconsejado la inseminación ha sido el rechazo de la monta; se consiguen del 80 al 85% de gestaciones, lo cual está muy cerca de las condiciones naturales de acoplamiento en las que estadísticamente se considera un 92% de gestaciones obtenidas.

Por el contrario, los resultados son mucho menos brillantes si la intervención se realiza a continuación de tratamientos hormonales contra la infertilidad (38-45% de éxitos) o si el propietario ha exigido la utilización de un semental cuyo esperma era de calidad mediocre.

Conclusión

La ayuda a la monta debe convertirse en un acto

Tabla IV. Protocolo para asistencia a la monta (Según Fontbonne)

rutinario para un veterinario especializado en medicina de animales de compañía. Esta intervención es valorizante para el clínico y sobre todo, responde a la demanda de numerosos criadores y propietarios de perros de pura raza.

El protocolo puede resumirse en la Tabla IV.

Inseminación artificial con semen congelado

1. Indicaciones

A todas las indicaciones de la asistencia a la monta, que permanecen válidas, se añaden indicaciones zootécnicas, económicas y sanitarias.

a) Indicaciones zootécnicas

Conservación del patrimonio hereditario en razas en vías de desaparición.

Sobre todo: eliminación de taras hereditarias por testaje.

Posibilidad de crear nuevas razas (material de investigación para los genetistas).

Conservación del semen de sementales excepcionales.

b) Indicaciones económicas

Se les puede evitar a hembras reproductoras de gran valor desplazamientos largos, costosos y fuente de stress.

Para un criador de varias razas, no le es necesario mantener varios sementales.

Posibilidad de exportación (bajo reserva de limitaciones legislativas).

c) Indicaciones sanitarias

Eliminación de enfermedades de transmisión sexual (brucelosis, sarcoma de Sticker principalmente).

2. Técnica

a) Recogida del esperma

La obtención del esperma se efectúa de la misma manera que en el semen fresco, con la dificultad consecuente a la ausencia de la hembra en celo, lo que, en ocasiones, hace problemática la erección y la eyaculación del macho.

Es útil disponer de una perra en celo, haciendo las funciones de "incitadora".

b) Examen del esperma

Se conservará únicamente la fracción epididimaria del eyaculado, rica en espermatozoides, y el examen del semen será mucho más estricto y riguroso.

Es indispensable una evaluación cuantitativa o espermiograma (realizado sobre cámara de Malassez o sobre cámara de Thomas).

Un esperma de buena calidad debe contener 400 x 10⁶ espermatozoides por mililitro.

Por otra parte es totalmente inútil congelar un semen que presenta más del 10% de formas anormales o menos del 60% de movilidad.

Las anomalías de los espermatozoides se clasifican

en 5 categorías:

-Cabeza, pieza intermedia, cola, gotita proximal, acrosoma (cuadro).

c) Colocación en pajuelas en diluyente/conservante y congelación

El espermatozoide se conserva en un diluyente, a la vez nutritivo y crioprotector, para el que existen diferentes fórmulas mantenidas más o menos en secreto por fabricantes y/o usuarios.

En la composición de estos diluyentes entran a formar parte la yema de huevo, el ácido cítrico, la fructosa, el glicerol y antibióticos.

Generalmente, se emplean 1,5 ml de diluyente por 100×10^6 espermatozoides, según el siguiente protocolo:

1. 0,5 ml de diluyente + espermatozoide a 37 °C durante 15 minutos, luego a 4 °C durante 30 minutos.

2. Añadir 0,5 ml de diluyente conservado a 4 °C y dejar en reposo 30 minutos.

3. Añadir finalmente el último tercio de diluyente, conservado también a 4 °C y dejar reposar 30 minutos.

4. El espermatozoide así diluido se reparte con una jeringa en las pajuelas de 0,5 ml, que contendrá cada una alrededor de 30×10^6 espermatozoides.

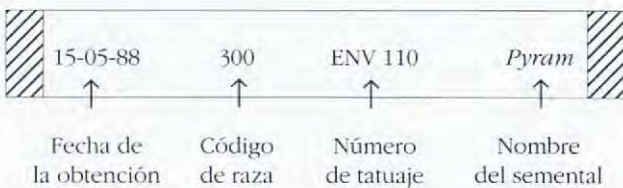
5. Estas pajuelas se dejan durante una hora a 4 °C y luego son congeladas en los vapores de nitrógeno (-70°) durante 10 minutos.

6. Inmediatamente, se colocan en nitrógeno líquido (-196°), donde pueden conservarse varios años.

En las pajuelas deben constar cuatro indicaciones:

- Fecha de la obtención.
- Raza del semental (número de código).
- Número del tatuaje.
- Nombre del semental (o sus cinco primeras letras).

Ejemplo:



Si las pajuelas no se utilizan en el banco de espermatozoide en que se conservan, el transporte debe realizarse en contenedores de nitrógeno líquido.

Evidentemente, las pajuelas congeladas sólo pueden manipularse mediante pinzas, bajo riesgo de quemaduras.

d) Descongelación

Si bien la congelación debe ser progresiva y lenta, la descongelación, por el contrario, debe ser extremadamente rápida; para ello se preconizan dos protocolos:

- 6 segundos a 75°.
- 30 segundos a 40°.

Una descongelación demasiado lenta ocasiona la aparición de microcristales intracelulares que destruyen la célula.

En cualquier caso, la congelación y, sobre todo, la descongelación, alteran de manera notable los espermatozoides y su poder fecundante es inferior al espermatozoide fresco.

e) Inseminación propiamente dicha

Puede realizarse por vía quirúrgica, por vía transcervical y por vía vaginal, como en la inseminación con espermatozoide fresco.

A nivel de los resultados, las cosas son bastante diferentes.

3. Resultados

Son claramente peores que con semen fresco. Puede en efecto apreciarse que la congelación y descongelación destruyen el 40% de los espermatozoides, y por lo tanto, quedan de 15 a 20×10^6 espermatozoides "útiles", por pajuela. Ahora bien, los especialistas coinciden en la cifra de 100×10^6 espermatozoides como indispensable para realizar una sola inseminación. Como son aconsejables dos inseminaciones con 48 horas de intervalo, es necesario utilizar dos veces cinco pajuelas.

Esto implica que la inseminación doble de una perra, emplea la mitad del espermatozoide obtenido del semental y que estamos muy lejos de las prestaciones obtenidas en el caso de animales de producción, en los que una sola obtención, permite fecundar decenas de hembras.

Por otra parte, las estadísticas evidencian los siguientes resultados:

- 80% de gestaciones mediante colocación quirúrgica del espermatozoide.
- 65% por inseminación transcervical.
- 25-30% por vía vaginal, mediante catéter de vidrio.

En un trabajo experimental que hemos realizado personalmente con el profesor Thuret, hemos podido conseguir dos gestaciones con prolificidad normal en tres perras inseminadas con la pistola Osiris con inseminación doble de cuatro pajuelas. Desgraciadamente, es un estudio demasiado limitado para permitir extrapolaciones estadísticas.

Paralelamente a los problemas técnicos, debe ponerse a punto un protocolo riguroso en el aspecto administrativo. El Banco de Espermatozoide de la Facultad de Veterinaria de Alfort ha estipulado un pliego de condiciones estricto:

Aparte de los responsables del banco, únicamente se permitirá recibir semen congelado y efectuar las inseminaciones a los veterinarios que hayan seguido una especialización y obtenido el diploma que atestigua esta especialización.

Deben disponer del siguiente material:

- Microscopio equipado de platina calentante.
- Baño-maría regulable a 37 °C.

-Contenedor de nitrógeno líquido para el transporte y conservación de la pajueta.

Para obtener el semen congelado, el veterinario debe remitir al banco de semen una autorización escrita del propietario del semental, indicando la identidad de la hembra a la que van destinadas las pajuetas.

El veterinario recibe entonces el material necesario para una doble inseminación.

Efectúa la inseminación y realiza con precisión la redacción del certificado de monta, testifica la realización de la inseminación sobre dicho certificado y lo remite al propietario de la hembra. Este último debe inmediatamente hacerlo firmar al propietario del semental.

4. Perspectivas

Si bien los resultados que se obtienen en estos momentos no son proporcionales a las esperanzas de los cinófilos, hay que admitir sin embargo, que estos últimos siguen con interés la puesta a punto del servicio que les significa el banco de esperma y veterinarios que se especialicen en estas técnicas.

Es necesario desarrollar las investigaciones en diferentes niveles:

-Mejorar las técnicas de conservación del semen para limitar la destrucción celular.

-Mejorar las técnicas de inseminación de cara a disminuir el número de pajuetas necesarias en cada inseminación.

-Organizar redes de veterinarios-inseminadores a disposición de sus colegas y de los criadores.

Estos son los objetivos que se ha propuesto el Banco de Semen Canino de la Facultad de Veterinaria de Maisons-Alfort, en colaboración con el ministro de Agricultura y la Sociedad Central Canina. Ha sido dotado de los medios en la medida de sus objetivos y nada se opone a que se alcancen.

Conclusión

La inseminación artificial con semen congelado es un trabajo de especialistas, supone una infraestructura compleja, investigaciones a efectuar, y por todo ello, se opone a la inseminación con semen fresco, que debe convertirse en un acto banal de práctica cotidiana.

Sin embargo, es indispensable que los veterinarios se interesen de manera activa por el desarrollo de estas técnicas, si quieren ser interlocutores válidos, expertos y apreciados por criadores y cinófilos.

Frotis vaginales, e inseminación artificial significan campos relativamente novedosos de actividad para el veterinario. Amplían su abanico de actividades a la cría y la reproducción canina.

Se trata de problemas apasionantes en los que todavía hay mucho por hacer. Nuestros interlocutores, los criadores y los cinófilos, están impacientes y cuentan con nosotros: convendría no decepcionarles.