

## **ESTUDIO DEL PROTOCOLO REPRODUCTIVO EN LA “FUNDACIÓN ONCE DEL PERRO GUÍA (FOPG)”**

### **STUDY OF THE REPRODUCTIVE PROTOCOL IN THE “GUIDE DOG ONCE FOUNDATION (FOPG)”**

**Rebeca Carmona Rupérez, Cristina Ortega Martín**

#### **RESUMEN**

La “Fundación ONCE del Perro Guía” está destinada a ofrecer perros guía a los discapacitados visuales. Para ello es muy importante controlar el ciclo reproductivo tanto de machos como de hembras con el fin de obtener el mayor número de animales aptos para su labor. El control se basa, en el caso de la hembra, en la detección de celo, la monta natural o inseminación artificial, el diagnóstico de gestación y el control de éste y del parto. En el caso del macho se basa fundamentalmente en el análisis de la calidad de su esperma. Además la fundación está llevando a cabo un novedoso programa de congelación de semen con el fin de conservar los individuos mejorantes.

Palabras clave: perros guía, celo, inseminación artificial, gestación, semen.

#### **SUMMARY**

The Guide Dog ONCE Foundation is appointed to offer guide dogs to blind people. The most important thing is to control the reproductive cycle of males and females in order to obtain the bigger sum of able animals to work. The control is based, in the female, in the detection of estrous, covering or artificial insemination, pregnancy test and control of this and the birth. In case of the male, it's essentially a quality sperm control. Also, the Foundation is developing a new freezing semen program to preserve the best.

Key words: guide dogs, estrous, artificial insemination, pregnancy, semen.

#### **INTRODUCCIÓN**

Las instalaciones de la Escuela de Adiestramiento de la Fundación ONCE del Perro-Guía (FOPG) se encuentran en Boadilla del Monte, Madrid. Desde su inauguración en 1999 ha entregado ya más de 1000 perros de forma gratuita a personas con discapacidad visual.

Su labor social consiste en la integración de los discapacitados visuales en la sociedad mediante la educación de perros guía que hagan más fácil su vida cotidiana.

Las razas de mejor carácter y más aptas para el aprendizaje son el Labrador, Golden Retriever y Pastor Alemán; actualmente están incorporando otra raza, el Flat Coated.

La educación del perro-guía comienza casi desde su nacimiento: a los dos meses pasa a formar parte de una familia que lo acoge hasta que el perro cumple aproximadamente un año.

Posteriormente el perro regresa a la Escuela de Adiestramiento y durante 4 meses los entrenadores trabajan los aspectos básicos de lo que será su función como guía: señalar bordillos y obstáculos, buscar camino entre las barreras de las ciudades, comportamiento en ámbitos públicos, reforzar la obediencia...

La asignación de los perros es una función muy delicada que la lleva a cabo el instructor: se han de evaluar varios factores como el grado de autonomía del futuro usuario, cualidades del carácter del animal (activo, ágil, inquieto, tranquilo...) y también se evalúa la forma física del mismo (mayor o menor envergadura del animal)

El objetivo de la Fundación es conseguir el mayor número de perros guía aptos que realicen su labor durante el mayor tiempo posible. Y para ello es fundamental el control exhaustivo del ciclo reproductivo.

## **DESARROLLO**

En primer lugar expondremos los métodos que se siguen en la **hembra** para lograr un buen resultado reproductivo de las mismas.

Lo más importante es evitar totalmente la consanguinidad para enriquecer las líneas genéticas y no introducir posibles anomalías congénitas.

La selección se lleva a cabo fundamentalmente realizando pruebas de comportamiento, observando la conformación anatómica y descartando la presencia de patologías congénitas y otras enfermedades.

Respecto a las pruebas de comportamiento se buscan animales con alta capacidad de aprendizaje, disciplinados, inteligentes y cariñosos. Se excluyen animales que presenten agresividad, miedo a ruidos, personas extrañas o aquellos que no sean del todo sociables.

En cuanto a la conformación anatómica se pretende mantener el estándar de cada una de las razas anteriormente mencionadas en altura, peso, capa y aparato genital. Además se necesita superar una serie de pruebas clínicas de cadera (displasia), codo (displasia, no unión del proceso acróneo, fragmentación del proceso coronoides) y hombro (displasia), alergias (alimentarias, a picadura de pulga u otro insecto, atopia), enfermedad congénita cardíaca (defecto de cierre de válvulas, soplos, alteraciones del ritmo o frecuencia), enfermedad oftalmológica: APR (atrofia progresiva de retina), catarata congénita subcapsular... y cualquier otro problema que le impida realizar su función de perro de trabajo durante el mayor tiempo posible.

### **Detección de celo e identificación del momento de máxima fertilidad.**

Es la parte fundamental ya que de ella va a depender la eficiencia reproductiva y por tanto el éxito del programa de reproducción.

Se basa, primeramente, en el reconocimiento de los signos clínicos de celo: la vulva aparece edematosa, enrojecida y prominente (Feldman y Nelson, 2007a). El primer día de sangrado se toma como primer día de proestro y a partir de entonces se comienzan a hacer citologías vaginales. Se hacen citologías seriadas mediante toma de muestra de mucosa vaginal con hisopo y posterior tinción tricrómica con el método Diagnóstico (Harris – Schorr simplificada) hasta la observación de un 80% de células cornificadas (queratinizadas o escamas acidófilas) (Dumon, 1997), cuando se comienzan a realizar análisis hormonales. (Figura 1).

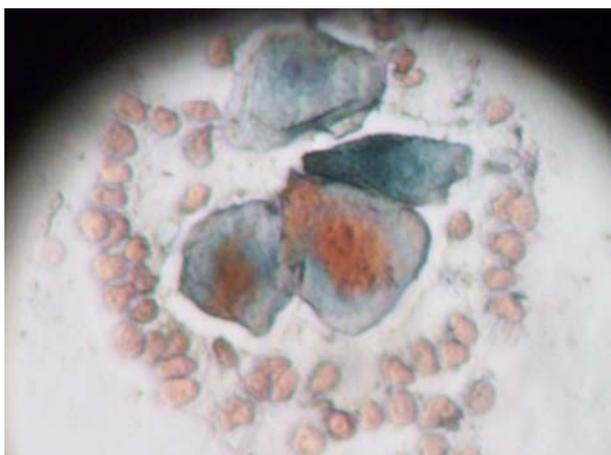


Figura 1: Tinción tricrómica Diagnóstico de un frotis vaginal: Fase final del proestro

También se pueden realizar análisis hormonales realizando la detección de progesterona (P4) en suero. Se deja formar el coágulo y luego se centrifuga. Si no se realiza de inmediato la valoración, hasta la determinación se debe mantener en refrigeración para evitar posibles alteraciones en los resultados. Existen tres métodos para detectar esta hormona:

El primero de ellos se trata de un ELISA cualitativo semicuantitativo cuya presentación es un kit comercial denominado “Ovucheck Premate”. Existe un control positivo casi transparente (P4 = 10 ng /ml) y un control negativo rosa (P4 =3 ng/ml); el color de la muestra resultante se determina en función de los dos anteriores por la tonalidad obtenida. Resultado en 15 minutos. (Figura 2).



Figura 2: Ovucheck Premate: Primer pocillo: Control negativo ( $P4 = 3 \text{ ng /ml}$ ); Segundo: Control positivo ( $P4=10 \text{ ng /ml}$ ) Siguietes: La primera perra no habrá ovulado todavía; en cambio las dos siguientes estarán listas para la monta.

El kit comercial BVT Ovulation Test también se trata de un ELISA cualitativo semicuantitativo. Mostrará mayor o menor tonalidad de azul en función de la concentración de P4: la P4 será superior a  $8 \text{ ng /ml}$  cuando la muestra esté incolora. Resultado obtenido en 10min.

Por último, la P4 también puede valorarse por medio de un análisis laboratorial mediante la técnica de quimioluminiscencia; obtendremos la concentración de P4 en máximo 24h. Hay que tener en cuenta que habrá que hacer la extracción de sangre en este caso con la mayor anticipación posible. Generalmente se tiene en cuenta más los resultados del laboratorio y los resultados de los kits nos permiten planificar rápidamente los cruces.

#### **Monta natural/Inseminación artificial.**

La primera monta, o en su defecto la inseminación intravaginal, se realizan cuando la P4 es de aproximadamente  $10 \text{ ng / ml}$  (periodo de ovocitación) que coincide con el día 2 del pico de LH (Dumon, 2001a).

La segunda monta / inseminación artificial tiene lugar a las 48 h de la primera (cuando se ha producido ya la maduración de los ovocitos)

El periodo de máxima fertilidad se encuentra en el rango de  $15 \text{ a } 20 \text{ ng / ml}$  de P4, cuando la mayoría de los ovocitos han sufrido una segunda meiosis y estarán maduros para ser fecundados. Por lo que si en la 2<sup>a</sup> monta el valor de progesterona no ha llegado a los  $15 \text{ ng / ml}$  realizamos una 3<sup>a</sup> monta.

Para realizar la inseminación transcervical la P4 debe tener unos valores de entre  $15 \text{ y } 20 \text{ ng / ml}$  para asegurar la maduración de los ovocitos ya que en esta se usa exclusivamente semen congelado y es de peor calidad que el fresco, siendo la motilidad progresiva y lineal inferior a la del semen fresco.

Con el endoscopio rígido se visualiza el cérvix y se introduce la sonda que tiene un catéter interno y un fiador que le da resistencia. En el catéter se cargan 4 pajuelas de 0,5ml con 50 millones de espermatozoides cada una (en total 200 millones). Sólo se ha realizado en una ocasión y el diagnóstico de gestación fue negativo.

En el caso de la inseminación por laparotomía, como en el caso anterior, la P4 debe estar entre 15 y 20 ng/ml porque igualmente se usa semen congelado.

Se realiza una pequeña incisión en la línea media, se localizan los cuernos uterinos y se inyecta en cada uno dos pajuelas de 0,5 ml, y por tanto 100 millones de espermatozoides en cada cuerno. En este caso no tenemos resultados valorables de fecundidad puesto que este método sólo se ha realizado en una ocasión y el diagnóstico de gestación fue negativo.

### **Diagnóstico de gestación**

Se realiza en primer lugar observando los signos clínicos que presenta la hembra, como son el aumento de peso y el diámetro abdominal, aumento del volumen de los pezones, y su distensión; unos días antes del parto pueden tener una secreción acuosa o incluso lechosa. Además los cambios de conducta son frecuentes (Lennoz, 1997).

La relaxina es la única hormona específica de la preñez conocida (es secretada por la placenta). Se detecta en sangre a partir de los 25 días de la ovulación y su pico máximo se produce del día 40 a 45 del pico de LH. Existen kits comerciales para su uso en la clínica.

La determinación de relaxina, por lo tanto, sí se puede utilizar como método de rutina para diagnóstico de preñez, sobre todo si no se posee un ecógrafo. Este ensayo se puede utilizar también en el caso perras que han tenido problemas reproductivos.

Actualmente este ensayo en la FOPG ya no se utiliza debido a la implantación de la **ecografía** como método principal.

El día 30 de la primera monta se hace la primera ecografía de gestación; si no se encuentra vesícula embrionaria, se repite a la semana, cuando se da el diagnóstico definitivo de gestante o no. No es útil para determinar el número de fetos presentes.

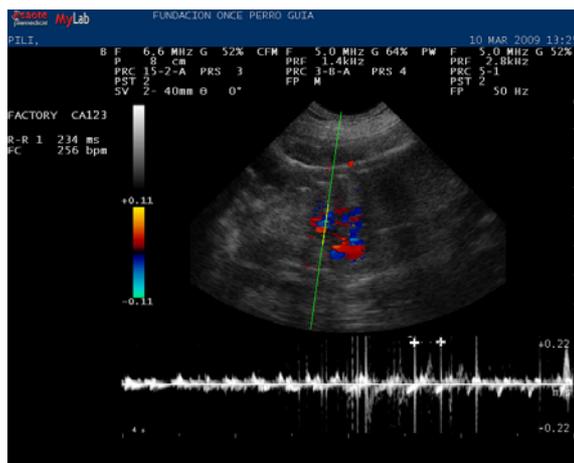


Figura 3: Ecografía doppler color: Latido cardiaco fetal detectado a los 45 días de gestación

### **Seguimiento de la gestación**

Se realiza principalmente con la ayuda de la ecografía y la radiología. Si la hembra está gestante, se realizará una nueva ecografía una semana antes de la fecha prevista para el parto (cuando empieza a disminuir la P4).

La radiología es un método seguro a partir del día 55 del pico de LH, porque ya comenzó la mineralización de los fetos (Lennoz, 1997). Se debe realizar con evacuación previa del intestino por enema o laxantes. Una vez comenzado el parto se hace la radiografía para determinar el nº exacto de fetos y diagnosticar posibles distocias.

### **Parto**

Las perras se han de llevar a la FOPG una semana antes de la fecha prevista del parto con el fin de extremar al máximo los cuidados pre-parto.

El parto se producirá a las 24-36 h de una determinación de P4 de menos de 2,5 ng /ml (Lennoz, 1997).

Se alojan de forma individual en habitaciones con ambiente controlado, hilo musical y decoración llamativa para estimular a los cachorros. Además existe un pequeño cuarto donde se encuentran los cachorros del cual la madre puede salir libremente al resto de la habitación y que además dispone de barandillas protectoras alrededor de las paredes para evitar posibles aplastamientos por parte de la madre.

Generalmente el parto tiene lugar de forma natural, sin apenas ayuda del personal.

La FOPG tiene un índice muy bajo de distocias, entre otras razones, porque las hembras son meticulosamente seleccionadas y si en algún parto dan algún problema se retiran como hembras de cría.

En el caso de problemas leves de mala colocación del feto, se hace una manipulación manual y en los casos de inercia uterina se administra calcio y suero glucosado, y posteriormente oxitocina para ayudar en las contracciones.

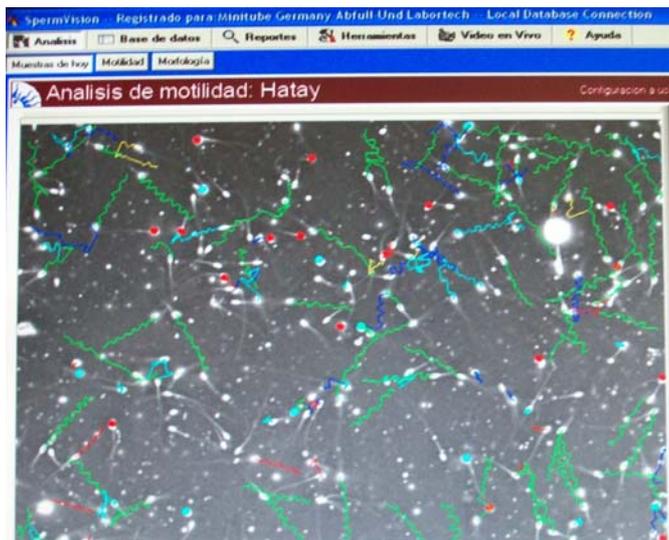
### Lactación

La lactación suele durar 38-40 días. A los 40 días se hace un destete muy progresivo incorporando unos días antes comida blanda a los cachorros para que se vayan adaptando.

La hembra de cría descansa un celo tras el parto antes de volverse a cubrir.

En el caso de los **machos**, es fundamental realizar una correcta selección de los sementales. Esta selección tiene lugar sobre el año de edad y normalmente se hace una línea de cría: se suelen seleccionar descendientes de machos ya probados. Las pruebas de comportamiento, conformación anatómica y ausencia de patologías congénitas y otras enfermedades son las mismas que en el caso de la hembra de cría.

La evaluación del eyaculado es de gran importancia para seleccionar un buen reproductor, y esto se realiza gracias al programa SpermVision®. Lo ideal es la obtención de muestras de semen cada dos meses para ir evaluando la calidad del mismo. (Figuras 4 y 5).



(Desviación estándar)(Totales)			
Celulas:	432	432	Mediana
Concentracion:	2,1060	2,1060	0,000
Motilidad:	95,1 %	95,14	(0,000) 0,0
Progressive motility:	78,5 %	78,47	(0,000) 0,0
Local motility:	16,7 %	16,7	(0,000) 0,0
Immotile:	4,86 %	4,86	(0,000) 0,0
Info campo		Morfología	
Info progresivos		Detalle de celula	
Hiperactivo:	22 % (22)		
Linear:	5,32 % (5,32)		
No-linear:	26,2 % (26,2)		
Curvilinear:	14,6 % (14,6)		

**Figuras 4 y 5:** SpermVision: Análisis de motilidad y resultados.

### Congelación de semen

La congelación es un método frecuente en otras especies animales, sin embargo en la especie canina es más común la monta natural. La FOPG está desarrollando un programa pionero de inseminación artificial y banco de semen.

La recogida del eyaculado se realiza mediante manipulación manual e inmediatamente se observan las características macroscópicas y el volumen obtenido. A continuación se evalúa la calidad del mismo sin diluir al microscopio con el programa SpermVision. Con el fin de

conservar la muestra en las mejores condiciones se diluye con yema de huevo y diluyentes comerciales y se coloca en refrigeración a 5°C. Una vez estabilizada la temperatura se vuelve a evaluar la calidad del semen y se envasa en pajuelas de 0,5 ml con 50 millones de espermatozoides aproximadamente cada una. Posteriormente introducimos las pajuelas en un abatidor que contiene vapores de nitrógeno y que es capaz de disminuir la temperatura a -150°C. Por último se almacenan en tanques de nitrógeno líquido para mantenerlas en congelación a -196°C por tiempo indefinido. Se deben realizar controles de la motilidad post-congelación antes de utilizar las pajuelas para inseminar.

Éxitos de fertilidad para:

- Monta natural: De las 10 intervenciones realizadas, 9 quedaron gestantes y una no debido a problemas de insuficiencia luteal, con progesteronemia de 9,2 ng/ml el día 30 de pico de LH, el mismo día que se hizo la ecografía de diagnóstico de gestación.
- Inseminación intravaginal con semen fresco: En 10 perras que no aceptan la monta natural, se realiza la inseminación intravaginal con semen fresco; de los 10 animales, 9 quedaron gestantes y una no debido a insuficiencia luteal, con progesteronemia de 6,4 ng/ml el día 30 de pico de LH.
- Inseminación transcervical con semen congelado: En la única intervención realizada, la hembra no quedó gestante debido a una insuficiencia luteal con progesteronemia de 8,5 ng / ml el día 30 de pico de LH.
- Inseminación por laparotomía con semen congelado. En la única intervención realizada, la hembra no quedó gestante, señalando como causa principal, a que el semen congelado presentaba una motilidad de tan sólo el 16%.

## CONCLUSIONES

1. La evaluación de progesterona es un método fundamental y el más fiable para la detección de la ovulación en la perra. (Dumon, 2001b)
2. Monta natural respecto a inseminación artificial: las diferencias no son significativas.
3. La ecografía es el principal método para el diagnóstico y control de la gestación (Lennoz, 1997). Sirve además para la valoración del sufrimiento fetal (mediante la medida de las frecuencias cardíacas).
4. El programa SpermVision nos permite evaluar de una manera más objetiva la calidad del semen (motilidad, morfología e integridad de membranas) (Feldman y Nelson, 2007b).
5. En la especie canina la congelación del semen es un buen método para conseguir buenos resultados de fertilidad y para conservar una buena reserva genética de machos mejorantes.

## **AGRADECIMIENTOS**

A todos los empleados y alumnos de prácticas de la FOPG, en especial a Alicia Hernández Avilés y a Luisa Segador González porque nos han ayudado mucho en la elaboración de este trabajo.

Y en especial a Simón Martí Angulo, nuestro tutor, por guiarnos en el tema elegido y aportarnos la información y ayuda necesaria en todo momento.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Dumon, C. Frotis vaginales en la perra. *Revista Pequeños Animales* (1997) 10: 12-18.
2. Dumon, C. Fisiología sexual: Aspectos prácticos. XVIII Congreso AMVAC. (2001a). Libro de ponencias y comunicaciones: pp. 17-25.
3. Dumon, C. Frotis vaginales y progesteronemia (Aplicaciones clínicas). XVIII Congreso AMVAC (2001b). Libro de ponencias y comunicaciones: pp. 27- 35.
4. Feldman, E y Nelson, R. Reproducción de la hembra canina. *Endocrinología y Reproducción Canina y Felina 3ª Edición*, Buenos Aires: Inter-médica, 2007a, pp. 834-897.
5. Feldman, E y Nelson, R. Reproducción del macho canino. *Endocrinología y Reproducción Canina y Felina 3ª Edición*, Buenos Aires: Inter-médica, 2007b, pp. 1038-1064.
6. Lennoz, M. Gestación en la perra. *Revista Pequeños Animales* (1997), 11:13-17.