



Archivos de Medicina Veterinaria
ISSN: 0301-732X
archmv@uach.cl
Universidad Austral de Chile
Chile

Sánchez, A.; Rubilar, J.

Obtención de cachorros mediante inseminación artificial con semen canino refrigerado.: Primera
descripción en Chile

Archivos de Medicina Veterinaria, vol. 33, núm. 1, 2001, pp. 105-110
Universidad Austral de Chile
Valdivia, Chile

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=173013744012>

- ▶ Cómo citar el artículo
- ▶ Número completo
- ▶ Más información del artículo
- ▶ Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Arch. med. vet. v.33 n.1 Valdivia 2001

Obtención de cachorros mediante inseminación artificial con semen canino refrigerado. Primera descripción en Chile

**Puppies obtained using artificial insemination with chilled extended semen.
First report in Chile**

A. SÁNCHEZ ^{*}. M.V., M.Sc. ; J. RUBILAR ^{*}. M.V

Instituto de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile,
Casilla 567, Valdivia, Chile. asancher@smtp.uach.cl

SUMMARY

Using a couple of Husky Siberian, it is described for the first time in Chile a kind of artificial insemination using cooled canine semen. The semen was obtained by digital manipulation and was diluted with UHT semi-skimmed milk and antibiotics in relation 1:4 and cooled at 5°C. There inseminations were carried out on the third day of the oestrus which was determined through vaginal cytology, considering the beginning of the oestrus when the superficial cells constituted over the 80% of the total vaginal cells in the vaginal smear. Inseminated was carried out using cooled doses for 24 and 48 hours and with an average concentration of 600×10^6 spermatozoa. The pregnancy diagnosis, through a real time ultrasonography, was done 28 days after the last insemination and the bitch gave birth to 4 normal puppies 61 days after last insemination.

Palabras claves: Canino, inseminación artificial, semen refrigerado.

INTRODUCCIÓN

El primer informe sobre el uso de la inseminación artificial en animales domésticos data de 1780, cuando el abate y fisiólogo italiano Lázaro Spallanzani obtuvo cachorros después de inseminar una perra con semen fresco ([Heape, 1897](#)). En la actualidad y dado que la reproducción y crianza de perros es una afición de distribución mundial, la preservación de semen y la inseminación artificial en la especie canina se ha constituido en tema de alto interés para los médicos veterinarios y criadores de perros de muchos países ([Sánchez, 1998](#)).

Si bien la inseminación artificial en las especies de interés zootécnico, es una biotecnología usada principalmente con el objeto de reproducir el mejor material genético ([Mc Donald, 1975](#)), en la especie canina representa además una herramienta clínica.

[Feldman y Nelson \(1996\)](#) y [Sánchez \(1998\)](#) destacan algunas de las aplicaciones clínicas de la inseminación artificial en perros, en las cuales la preservación y transporte de semen serían fundamentales.

1. Hembras nerviosas o con problemas de conducta, que rehusan el apareamiento o se comportan de manera agresiva con el macho.
2. Hembras con vagina estrecha, lo que dificulta la penetración y origina dolor, motivo por el cual la perra rehuye el apareamiento.
3. Machos con rigidez o debilidad de las extremidades posteriores.
4. Machos en los cuales la erección del pene ocurre demasiado temprano, imposibilitando la penetración debido al engrosamiento del bulbo del glande.
5. Machos de menor tamaño que las hembras, lo cual imposibilita la monta.
6. Reproductores separados geográficamente de la hembra en el período de estro.

No obstante que varios trabajos han entregado una basta información acerca de la manipulación, preservación e inseminación artificial con semen canino fresco, refrigerado y congelado ([Gill y col., 1970](#); [Farstad, 1984](#); [Tsutsui y col., 1988](#); [Linde-Forsberg y Forsberg, 1989](#); [Linde-Forsberg y Forsberg, 1993](#); [Linde-Forsberg, 1994](#); [Linde-Forsberg, 1995](#); [Rota y col., 1995](#); [Antelo, 1998](#)), en Chile no se registran antecedentes sobre el uso de inseminación artificial en la especie canina. Por esta razón el propósito de este trabajo es evaluar la capacidad fecundante de espermatozoides caninos conservados a temperatura de refrigeración y empleados en inseminación artificial.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para este trabajo se ocupó un macho de un año (20 Kg) y una hembra de siete años (18 Kg), ambos de raza Siberian Husky, clínicamente sanos. El macho, dada su edad, no había sido usado como reproductor anteriormente y la hembra tenía un registro de 6 camadas, con un promedio de 5 cachorros.

Evaluación de la hembra: Al cuarto mes después del último celo, la hembra fue controlada para observar el inicio del proestro a través de signos de actividad estrogénica, tales como edema vulvar y secreción sanguinolenta en la comisura ventral de la vulva ([Johnston, 1995](#)); además, un día a la semana, se obtuvieron frotis vaginales con tórlula de algodón, los cuales fueron fijados con metanol, teñidos con tinción Giemsa y examinados con microscopio de luz directa a 100 x y 400 x ([Sánchez, 2000](#)). Una vez evidenciado clínicamente el inicio del proestro, los frotis fueron obtenidos diariamente, evaluando la cinética de las células superficiales (Nº de células superficiales / Nº de células totales x 100). Cuando el porcentaje de células superficiales fue superior al 80% la perra fue mantenida en confinamiento a fin de realizar un adecuado control del estro.

Evaluación del macho: Al perro se le realizó un examen andrológico completo ([Feldman y Nelson,](#)

muestras seminales fueron evaluadas de acuerdo a la metodología propuesta por [Díaz y Arancibia \(1971\)](#) para la calificación de la fertilidad potencial de los animales domésticos; registrándose color, volumen, olor y características microscópicas como porcentaje de motilidad progresiva, concentración espermática y porcentaje de espermatozoides vivos.

Procesamiento del semen e Inseminación Artificial: Despues del análisis seminal, se procedió a la dilución del semen con un diluyente sobre la base de leche semi-descremada UHT¹ (0,5% materia grasa) y antibióticos: estreptomicina² 50 mg/100 ml y penicilina sódica³ 5 mg/100ml, el cual fue mantenido e incorporado al semen a una temperatura aproximada de 25°C ([Sánchez y col., 1995](#)). La dilución se hizo mezclando gradualmente 4 ml de diluyente por 1 ml de semen ([Linde-Forsberg, 1995](#)). Una vez finalizada la dilución se evaluó la motilidad progresiva bajo microscopio de contraste de fase con platina térmica a 37°C. El semen diluido se fraccionó en volúmenes de 4 ml en tubos de plástico cónicos⁵ y puesto en un refrigerador a 5°C. El semen fue evaluado nuevamente para motilidad progresiva después de 24 y 48 horas de refrigeración.

Las inseminaciones comenzaron a realizarse al tercer día del estro citológico (> 90% de células superficiales en el frotis vaginal), repitiéndose 24 y 48 horas más tarde. Antes de la inseminación se retiró el semen del refrigerador y se dejó en adaptación por 30 minutos a temperatura ambiente (aproximadamente 20°C). Para depositar el semen en el fondo vaginal se usó un espéculo tubular de 15 cm, una pipeta de inseminación de bovino y una jeringa plástica de 10 ml. Inmediatamente después de la inseminación la región perineal fue masajeada con el propósito de estimular el transporte espermático ([Andersen, 1980](#)) y la perra mantenida con el tren posterior elevado en un ángulo de 60° por alrededor de 15 minutos a fin de evitar el reflujo del semen ([Farstad, 1984](#); [Tsutsui y col., 1988](#)). La concentración espermática empleada en cada inseminación fue de no menos de 600 millones de células espermáticas totales por dosis en un volumen que varió entre 5 y 8 ml.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El estudio del estro de la perra mediante la citología vaginal permitió evaluar indirectamente el aumento de estrógenos sanguíneos, medido por su efecto sobre el epitelio vaginal, aumentando la proporción de células de las capas superficiales ([Johnston, 1995](#)). La presencia de más de un 80% de células superficiales en frotis vaginales de perras reproductivamente sanas se puede considerar como estro ([Shille, 1989](#); [Wright, 1991](#)). Este último aspecto es de mucho interés, por cuanto la citología vaginal permite la detección de estro en perras que no manifiestan signos externos y/o que rechazan la presencia del macho ([Feldman y Nelson, 1996](#); [Sánchez, 1998](#)).

Las características macroscópicas y microscópicas de los eyaculados ([cuadro 1](#)), junto con el examen físico permitieron calificar satisfactoriamente al reproductor, especialmente al considerar que la motilidad progresiva alcanzó un 90% y que el promedio descrito en perros de un año de edad no supera el 65% ([Tello y col., 1988](#)).

Cuadro 1. Características macroscópicas y microscópicas de los eyaculados caninos
00000000procesados para inseminación artificial.

00000000Macroscopic and microscopic characteristics of the ejaculates used in artificial insemination.

CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS			
	Volumen	Color	Olor
Eyaculado 1	3 ml	blanco	suis generis
Eyaculado 2	2 ml	blanco	suis generis
CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS			
	Motilidad (%)	Vitalidad (%)	Concentración (esp./mm ³)
Eyaculado 1	90	90	338.000
Eyaculado 2	90	90	752.000

Cabe destacar que la motilidad progresiva de los espermatozoides, inmediatamente después de la dilución, se mantuvo en 90% y en las evaluaciones posteriores a las 24 y 48 horas de refrigeración, los valores observados en ambos eyaculados fueron de 80 y 60 %, respectivamente. Estos valores son semejantes a los descritos por [Rota y col. \(1995\)](#), quienes empleando un diluyente en base a yema de huevo - TRIS, conservaron el semen diluido a una temperatura de 4°C, observando motilidades progresivas de 73,6 y 70,4 % a las 24 y 48 horas de refrigeración, respectivamente.

La mantención de buenos niveles de motilidad progresiva en el semen refrigerado con diluyentes en base a leche semi-descremada se puede atribuir a las características protectoras de la caseína y los fosfolípidos de la leche, biomoléculas capaces de estabilizar y regular la integridad de la membrana espermática frente al shock térmico ([Varner y col. , 1988](#)), condición que también poseen los fosfolípidos de la fracción lipoproteica de baja densidad de la yema de huevo ([Cookson y col. , 1984](#)).

Las características de las dosis de semen empleadas en esta experiencia se muestran en el [cuadro 2](#), destacando que se inseminó con un promedio de 600 millones de espermatozoides totales por dosis, cantidad superior a la descrita en ensayos con semen fresco ([Tsutsui y col. , 1988](#)) y semen refrigerado ([Gill y col. , 1970](#)), quienes usando dosis de inseminación con 200 millones de espermatozoides móviles e inseminando intravaginalmente a perras Beagle, obtuvieron 100 y 80 % de preñeces, respectivamente.

Cuadro 2. Características de las dosis de semen canino refrigerado empleados en inseminación artificial 00000005°C. El semen fue evaluado nuevamente para motilidad progresiva después de 24 y 48 horas de refrigeración.

00000000Characteristics of the chilled extended semen doses using in artificial insemination

Eyaculado	Tiempo de refrigeración		Espermatozoides	Espermatozoides
	Nº	del semen (hrs)	por dosis (x 10 ⁶)	móviles por dosis (x 10 ⁶)
1 ^a Inseminación	1	24	676,0	540,8
2 ^a Inseminación	1 y 2	24 y 48	939,6	650,3
3 ^a Inseminación	2	48	631,7	379,0

ultrasonografía de tiempo real. En dicha oportunidad se visualizaron vesículas gestacionales y latido cardíaco fetal ([Inaba y col. , 1984](#)). Finalmente 61 días después de la última inseminación la perra parió 4 cachorros vivos.

Si bien el resultado de esta inseminación artificial fue satisfactorio, cabe señalar que lo óptimo en un programa de reproducción asistida en caninos es precisar el momento de la ovulación en la perra, ya que se sabe que los mejores resultados de fertilidad, expresados en tasa de concepción y tamaño de camada, se logran cuando la hembra es cubierta o inseminada 2 a 3 días después de la ovulación ([Linde-Forsberg, 1994](#); [Concannon, 1998](#)), lo cual se explica porque la ovulación en la perra ocurre con ovocitos primarios, vale decir con su núcleo en estado de vesícula germinativa, en la profase de la primera división meiótica ([Tsutsui, 1989](#)). La meiosis se reinicia un día después de la ovulación, generalmente en la porción media del oviducto. La maduración ovocitaria, implica que el gameto finalice la primera división meiótica e inicie la segunda, quedando detenido en la segunda metafase de la meiosis. Sólo después de la maduración (2 a 3 días) el ovocito está apto para ser fecundado ([Farstad, 2000](#)). Un buen recurso para evaluar si la ovulación ha ocurrido, es la determinación de progesterona plasmática o sérica, la cual debería comenzar a medirse a partir de la fase de proestro tardío ([Linde-Forsberg, 1995](#)).

Esta experiencia, primera en Chile de acuerdo a nuestros antecedentes, destaca la factibilidad de conservar semen canino por períodos superiores a un día mediante la dilución del semen en un medio adecuado y conservándolo a temperatura de refrigeración. Esto permitirá el desplazamiento de material genético entre ciudades dentro del país. Cabe señalar que el diluyente empleado es fácil de obtener, ya que se prepara con una leche larga vida semi-descremada comercial y, por otra parte, la refrigeración del semen en la actualidad no constituye un obstáculo.

RESUMEN

Empleando una pareja de perros Siberian Husky, se describe, por primera vez en Chile, una inseminación artificial empleando semen canino refrigerado. El semen fue obtenido por manipulación digital y diluido con leche semidescremada UHT con antibióticos en relación 1:4 y refrigerado a 5°C. Se practicaron 3 inseminaciones a partir del tercer día del estro, el cual fue determinado mediante exámenes de citología vaginal, considerándose inicio del estro cuando las células superficiales constituyan sobre el 80% del total de células vaginales en los frotis. Se inseminó con dosis refrigeradas por 24 y 48 horas y con una concentración promedio de 600 millones de espermatozoides totales. El diagnóstico de gestación, mediante ecógrafo de tiempo real, se realizó 28 días después de la última inseminación y la perra parió 4 cachorros vivos 61 días después de la última inseminación.

* Becario de Conicyt, Programa de Doctorado en Ciencias Veterinarias.

**Programa de Magíster en Ciencias, Mención Reproducción Animal.

¹ Leche descremada UHT (Colun®)

² Laboratorio Chile

³ Corninig®

BIBLIOGRAFÍA

ANDERSEN, K. 1980. Artificial Insemination and Storage of Canine Semen. En: Morrow, D. (ed.). Current Therapy in Theriogenology, Diagnosis, Treatment and Prevention of Reproductive Diseases in Animals. W.B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 661-665.

ANTELO, R. 1998. Técnicas de inseminación artificial en caninos. Curso Tópicos de Clínica Reproductiva e Inseminación Artificial en Caninos. Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile, pp. 63-65.

CONCANNON, P. 1998. Phisiology of canine ovarian cycles and pregnancy. En: Advances in Canine Reproduction. Linde-Forsberg, C. (ed.). Mini-symposium. Uppsala, Sweden.

COOKSON, A., A. THOMAS, J. FOULKES. 1984. Immunochemical investigation of the interaction of egg-yolk lipoproteins with bovine spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 70: 599-604.

- FARSTAD, W. 1984. Bitch fertility after natural mating and after artificial insemination with fresh or frozen semen. *J. Small Anim. Pract.* 25: 561-565.
- FARSTAD, W. 2000. Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology* 53: 175-186.
- FELDMAN, E., R. NELSON. 1996. Canine and Feline Endocrinology and Reproduction. W. B. Saunders Co. Philadelphia, USA.
- GILL, H., C. KAUFMAN, R. FOOTE, W. KIRK. 1970. Artificial insemination of beagle bitches with freshly collected, liquid-store, and frozen-stored semen. *Am. J. Vet. Res.* 31: 1807-1813.
- HEAPE, W. 1897. Artificial insemination of mammals and the subsequent fertilisation or impregnation of their ova. *Proc Royal Soc. London*: 61: 52-56. Citado por Farstad, W. 2000. Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology* 53: 175-186.
- INABA, T., N. MATSUI, R. SHIMIZU, T. IMORI. 1984. Use of echography in bitches for detection of ovulation and pregnancy *Vet. Rec.* 115: 276-277.
- JOHNSTON, S. 1995. Breeding management of the bitch. En: Ettinger, S., E. Feldman (eds.). *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. W.B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 1604-1606.
- LINDE-FORSBERG, C., M. FORSBERG. 1989. Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. *J. Reprod. Fertil.* 39 (Suppl.): 299-323.
- LINDE-FORSBERG, C., M. FORSBERG. 1993. Results of 527 controlled artificial inseminations in dogs. *J. Reprod. Fertil.* 47 (Suppl.): 313-323.
- LINDE-FORSBERG, C. 1994. Artificial insemination in the dog. W.S.A.V.A. XIX World Congress, Durban, South Africa, pp. 606-611.
- LINDE-FORSBERG, C. 1995. Artificial insemination with fresh, chilled extended and frozen-thawed semen in the dog. En: Memon, M. (ed.) *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animals)*. W.B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 48-58.
- Mc DONALD, L. 1975. *Veterinary Endocrinology and Reproduction*. 2nd Ed. Lea & Febiger.
- ROTA, A., B. STRÖM, C. LINDE-FORSBERG. 1995. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. *Theriogenology*. 44: 885-900.
- SANCHEZ, A., W. VON FREY, M. DE LOS REYES. 1995. Efecto de diluyentes y plasma seminal en la preservación de espermatozoides equinos refrigerados. *Vet. Arg.* 113: 172-178.
- SÁNCHEZ, A. 1998. Inseminación artificial en perros. IV Curso Internacional de Medicina y Cirugía en Pequeños Animales. MEVEPA V Región - Universidad de Chile. Concón, Chile, pp. 122-131.
- SÁNCHEZ, A. 2000. Examen clínico reproductivo en la perra doméstica. *Curso Tópicos en Reproducción de Pequeños Animales*. Universidad de Chile. Santiago, Chile, pp. 60-66.
- SHILLE, V. 1989. *Reproductive Physiology and Endocrinology of the Female and Male*. En: Ettinger, S. (ed.). *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. W. B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 1777-1791.
- TELLO, L., M. DE LOS REYES, A. BERNAL. 1988. Descripción de algunas características seminales en caninos de raza ovejero alemán. *Avances en Cs. Vet.* 3: 52-56.
- TSUTSUI, T., T. TEZUKA, T. SHIMIZU, I. MURAO, E. KAWAKAMI, A. OGASA. 1988. Artificial insemination with fresh semen in Beagle bitches. *Jpn. J. Vet. Sci.* 50 : 193-198.
- TSUTSUI, T. 1989. Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. *J. Reprod. Fertil.* 39 (Suppl.): 269-275.
- VARNER, D., T. BLANCHARD, T. LOVE, C. GARCIA, R. KENNEDY. 1988. Effect of the cooling rate and

WRIGHT, P. 1991. Practical aspects of the estimation of the time of ovulation and of insemination in the bitch. *Aust. Vet. J.* 68:10-13.

Aceptado: 24.04.2001