

Libros de **Cátedra**

Manual de reproducción de animales de producción y compañía

Stornelli María Alejandra
De la Sota Rodolfo Luzbel

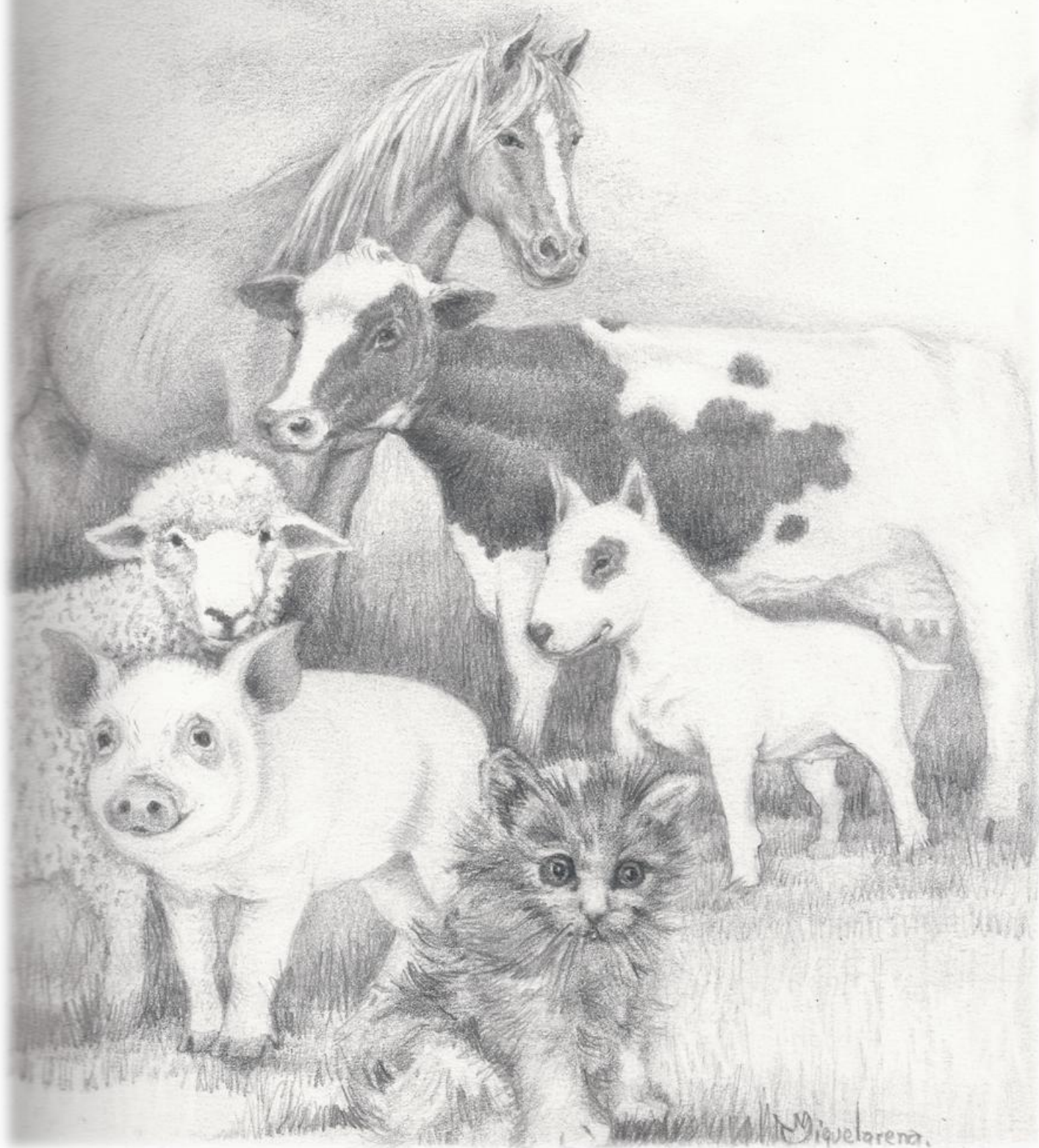
FACULTAD DE
CIENCIAS VETERINARIAS

n
naturales



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

MANUAL DE REPRODUCCIÓN DE ANIMALES DE PRODUCCIÓN Y DE COMPAÑÍA



MANUAL DE REPRODUCCIÓN

DE ANIMALES DE PRODUCCIÓN Y COMPAÑÍA

Stornelli María Alejandra
De la Sota Rodolfo Luzbel

Facultad de Ciencias Veterinarias



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA



Editorial
de la Universidad
de La Plata

Al Dr. Angel Russo, quien fue Profesor durante más de 30 años en Reproducción Animal en la Facultad de Ciencias Veterinarias de La Plata. El doctor Angel Russo ha dedicado su vida a la docencia dejando su impronta en el dictado de los cursos de grado de Reproducción Animal.

Ha logrado no sólo la formación académica de innumerables alumnos de grado y posgrado sino también la formación humana de ellos pues ha sido y es ejemplo de vida.

Nuestro agradecimiento

A la Universidad Nacional de La Plata que ha hecho posible la presentación de este libro

A la Licenciada en Bellas Artes Teresita Miquelarena quien gentilmente realizó la portada del libro

*“Yo no enseño a mis alumnos, sólo les
proporciono las condiciones en las que
puedan aprender”*
ALBERT EINSTEIN

Prólogo

El avance de la Ciencia Veterinaria ha impulsado la evolución del conocimiento de un modo impensado. Este hecho hace que la educación en Reproducción Animal, al igual que en el resto de la Medicina Veterinaria, haya desbordado todo posible intento de ir a la velocidad de los avances en el área. Tal vez es ahora el momento de pararse y “mirar la cancha”. En este intento de acomodar las piezas del rompecabezas de la docencia es que intentamos brindar el primer escalón para que a partir de él, los alumnos y también a aquellos profesionales que han decidido hoy dedicarse a Reproducción Animal puedan construir una gran escalera dirigida al éxito profesional.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	20
--------------	----

SECCIÓN I

Caninos y Felinos	21
-------------------	----

PARTE I

ANATOMÍA DEL APARATO GENITAL	22
------------------------------	----

Capítulo 1

Anatomía del aparato genital femenino	23
---------------------------------------	----

Romina Gisele Praderio

Capítulo 2

Anatomía del aparato genital masculino	36
--	----

Romina Gisele Praderio

PARTE II

FISIOLOGÍA REPRODUCTIVA	46
-------------------------	----

Capítulo 3

Ciclo estral canino	47
---------------------	----

María Cecilia Stornelli

Capítulo 4

Ciclo estral felino	70
---------------------	----

María Carla García Mitacek

Capítulo 5

Fisiología del servicio canino	77
--------------------------------	----

María Alejandra Stornelli, María Florencia García

Capítulo 6

Fisiología del servicio felino 83

Romina Nuñez Favre

Capítulo 7

Organización y endocrinología del aparato reproductor masculino 90

Romina Nuñez Favre

Capítulo 8

Estacionalidad reproductiva en el gato doméstico 122

Romina Nuñez Favre

Capítulo 9

Refractariedad al estímulo lumínico 115

Romina Nuñez Favre

Capítulo 10

Gestación en la perra y en la gata 122

María Cecilia Stornelli, María Carla García Mitacek

Capítulo 11

Parto eutócico y distócico 142

María Alejandra Stornelli

PARTE III

MÉTODOS COMPLEMENTARIOS DE DIAGNÓSTICO 154

Capítulo 12

Extracción y evaluación seminal en caninos 155

Claudia Marcela Tittarelli

Capítulo 13

Extracción y evaluación seminal en felinos 176

María Candela Bonaura

Capítulo 14

Ultrasonografía reproductiva en pequeños animales 191

María Carla García Mitacek

PARTE IV

CONGELACIÓN DE SEMEN E INSEMINACIÓN ARTIFICIAL	221
--	-----

Capítulo 15

Efecto del proceso de criopreservación sobre la fertilidad seminal	222
--	-----

María Alejandra Stornelli

Capítulo 16

Fertilidad y supervivencia del semen canino criopreservado	235
--	-----

María Alejandra Stornelli

Capítulo 17

Criopreservación de espermatozoides felinos	253
---	-----

María Candela Bonaure

Capítulo 18

Inseminación artificial en caninos	264
------------------------------------	-----

María Alejandra Stornelli

Capítulo 19

Inseminación artificial en felinos	282
------------------------------------	-----

María Candela Bonaure

PARTE V

AFECCIONES DEL APARATO REPRODUCTOR	288
------------------------------------	-----

Capítulo 20

Enfermedades reproductivas del macho	289
--------------------------------------	-----

Romina Nuñez Favre- María Alejandra Stornelli

Capítulo 21

Enfermedades reproductivas de la hembra canina	314
--	-----

Romina Gisele Praderio

Capítulo 22

Tumores mamarios en hembras caninas	336
-------------------------------------	-----

María Cecilia Stornelli

Capítulo 23

Afecciones mamarias en hembras felinas _____ 346

María Alejandra Stornelli

Capítulo 24

Enfermedades reproductivas de la hembra felina _____ 359

María Carla García Mitacek

PARTE VI

CONTROL DE LA REPRODUCCIÓN _____ 366

Capítulo 25

Anticoncepción en la perra y en la gata _____ 367

María Cecilia Stornelli

Capítulo 26

Interrupción de la gestación en la perra _____ 376

María Cecilia Stornelli

Capítulo 27

Inducción de ciclos estrales en la perra _____ 382

María Cecilia Stornelli

Capítulo 28

Interrupción de la gestación en la gata _____ 389

María Carla García Mitacek

Capítulo 29

Inducción de ciclos estrales en la gata _____ 398

María Carla García Mitacek

PARTE VII

BIOTECNOLOGÍAS REPRODUCTIVAS ESPECIALES _____ 403

Capítulo 30

Recuperación espermática epididimal como medio para preservar material genético ____ 404

Claudia Marcela Tittarelli

SECCIÓN II: EQUINOS _____ 419

Capítulo 31 _____ 420

Extracción y evaluación de semen en el padrillo

Miriam Azcurra- Jessica Vleck

SECCIÓN III: PORCINOS _____ 442

PARTE I

ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA REPRODUCTIVA _____ 443

Capítulo 32

Anatomía reproductiva y examen del tracto reproductivo _____ 444

Maricel Compagnoni, Valeria Fernández, Hernán Barrales, Sara Williams

Capítulo 33

Fisiología del ciclo estral de la cerda _____ 453

Valeria Fernández, Hernán Barrales, Maricel Compagnoni, Sara Williams

Capítulo 34

Gestación en la especie porcina _____ 459

Sara Williams, Valeria Fernández, Maricel Compagnoni, Hernán Barrales

Capítulo 35

Parto y puerperio en la especie porcina _____ 467

Hernán Barrales, Valeria Fernández, Maricel Compagnoni, Sara Williams

PARTE II

BIOTECNOLOGÍAS REPRODUCTIVAS _____ 475

Capítulo 36

Manejo del ciclo estral en la cerda 476

Sara Williams, Valeria Fernández, Maricel Compagnoni, Hernán Barrales

Capítulo 37

Recolección y evaluación de semen porcino 482

Valeria Fernández, Hernán Barrales, Maricel Compagnoni, Sara Williams

Capítulo 38

Criopreservación de semen porcino 488

Sara Williams, Valeria Fernández, Maricel Compagnoni, Hernán Barrales

Capítulo 39

Inseminación artificial en la especie porcina 497

Sara Williams, Valeria Fernández, Maricel Compagnoni, Hernán Barrales

PARTE III

MÉTODOS COMPLEMENTARIOS DE DIAGNÓSTICO 506

Capítulo 40

Ultrasonografía reproductiva 507

Sara Williams, Valeria Fernández, Maricel Compagnoni, Hernán Barrales

PARTE IV

PATOLOGÍAS REPRODUCTIVAS 518

Capítulo 41

Patologías reproductivas en la hembra porcina 519

Hernán Barrales, Valeria Fernández, Maricel Compagnoni, Sara Williams

Capítulo 42

Patologías reproductivas del macho porcino 526

Maricel Compagnoni, Hernán Barrales, Valeria Fernández, Sara Williams

PARTE V

MANEJO REPRODUCTIVO	531
---------------------------	-----

Capítulo 43

Manejo reproductivo en producción porcina	532
---	-----

Hernán Barrales, Valeria Fernández, Maricel Compagnoni, Sara Williams

SECCIÓN IV: BOVINOS	546
---------------------------	-----

PARTE I

CLÍNICA REPRODUCTIVA BOVINA	547
-----------------------------------	-----

Capítulo 44

Evaluación de la aptitud reproductiva del toro	448
--	-----

Adrián Leopoldo Bottino, Ana Lorena Migliorisi

Capítulo 45

Examen biológico del semen: evaluación de semen en bovinos	561
--	-----

Ana Lorena Migliorisi, Maria Verano Gomez, Laura Vanina Madoz

Capítulo 46

Evaluación de la aptitud reproductiva de la hembra bovina	573
---	-----

Maria Jaureguiberry, Ana Lorena Migliorisi, Maria Verano Gomez, Walter Gaston Aldabe

Capítulo 47

Enfermedades del tracto reproductivo de la hembra bovina	592
--	-----

Laura Vanina Madoz, Maria Jaureguiberry

Capítulo 48

Neonatología bovina	607
---------------------------	-----

Maria Jaureguiberry, Joaquin Chiozza Logroño

Capítulo 49

Utilización de la ultrasonografía en el manejo reproductivo en explotaciones lecheras _	623
---	-----

German Domínguez, R. Luzbel de la Sota

SECCIÓN V: OVINOS _____ 637

Capítulo 50

Exploración ultrasonográfica del aparato genital de la oveja y de la cabra _____ 638

Andrés Telésforo Soto, María Verano Gómez

Capítulo 51

Pérdidas embrionarias y fetales en ovinos _____ 663

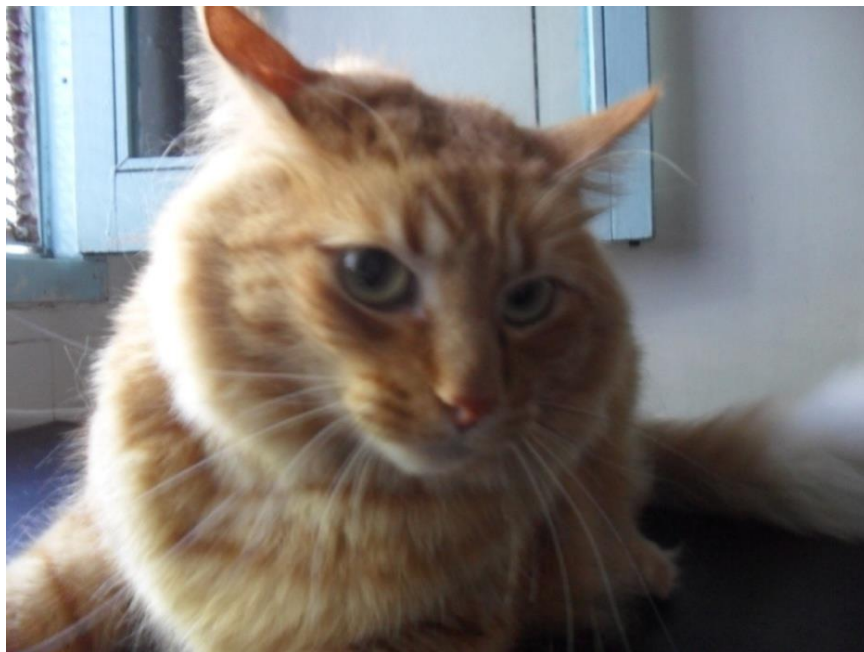
*María Macarena Bruno-Galarraga, Marcela Isabel Cueto, Alejandro Eduardo Gibbons,
Jimena Fernánd, Isabel María Lacau, R. Luzbel de la Sota.*

INTRODUCCIÓN

Este libro presenta los conocimientos básicos de fisiología reproductiva y fisiopatología de los animales de producción y compañía con el fin de introducir al lector en la reproducción animal en Medicina Veterinaria. La obra se encuentra dividida en secciones utilizando una sección para cada especie. Se presentan los contenidos básicos a partir de los cuales el lector podrá construir los conocimientos necesarios para la práctica reproductiva diaria.

SECCIÓN I

Caninos y Felinos



PARTE I

Anatomía del aparato genital

Romina Gisele Praderio



CAPÍTULO 1

Anatomía del aparato genital femenino

Romina Gisele Praderio

Hembra canina

Introducción

El conocimiento de las particularidades anatómicas del tracto genital de la hembra canina permitirá realizar un correcto examen ginecológico. Este hecho posibilitará recorrer uno de los primeros tramos del camino hacia la aproximación diagnóstica de las enfermedades reproductivas de la hembra.

El tracto reproductivo de la hembra canina está compuesto por un conjunto de órganos interrelacionados entre sí, cada uno con una función diferente e indispensable para la reproducción de la especie. Los órganos del aparato reproductor se dividen en internos y externos. Dentro de los órganos internos se incluye a los ovarios, trompas uterinas, útero, vagina y vestíbulo; y como genitales externos podemos nombrar a la vulva, clítoris y glándulas mamarias. En este capítulo describiremos la estructura, función y localización anatómica de cada uno de ellos lo cual nos permitirá abordar el examen ginecológico, tópico que también será abordado en este capítulo.

Ovarios

Los ovarios o gónadas femeninas, son dos estructuras de pequeño tamaño, de forma oval y alargada que poseen una longitud media de 2 cm y se encuentran ubicados dentro de la cavidad abdominal, cada una en relación al polo caudal del riñón correspondiente (Sisson y Grossman, 1982). El ovario izquierdo está localizado 1 a 3 cm caudal al riñón izquierdo y aproximadamente 13 cm caudal a la última costilla y está relacionado, lateralmente, con el bazo. El ovario derecho se encuentra 10 cm caudal a la última costilla del correspondiente lado, situado entre la parte derecha del duodeno y la pared abdominal lateral (Sisson y Grossman, 1982; Johnston y col., 2001). Esta ubicación anatómica hace más sencillo el acceso al ovario izquierdo cuando se realiza una laparotomía por línea media. La ubicación más craneal del ovario derecho dificulta su acceso en el procedimiento descripto.

En la hembra canina, cada ovario se encuentra rodeado por una capa de tejido peritoneal que lo envuelve completamente formando una bolsa, denominada bolsa ovárica (Foto 1), ésta no permite la observación directa del ovario, por lo cual debemos hacer una incisión en la misma para poder inspeccionarlo. El tejido peritoneal que forma la bolsa ovárica, está compuesto por dos capas, una externa y otra interna. Estas capas contienen gran cantidad de grasa y músculo liso y continúan su recorrido hacia el cuerno del útero formando así el mesosalpinx y el ligamento propio del ovario. En perras añejas y obesas el tejido adiposo que conforma a la bolsa es muy abundante, lo cual hace difícil también la visualización de las trompas uterinas (Sisson y Grossman, 1982; Johnston y col., 2001).

Los ovarios tienen como función la producción y expulsión hacia las trompas (ovulación) de ovocitos, y la producción y secreción de las hormonas femeninas, estrógenos y progesterona. Cuando la hembra alcanza la pubertad comienza la actividad ovárica, desarrollándose los folículos ováricos, quienes van transitando por distintos estadios hasta alcanzar el desarrollo necesario para que ocurra la ovulación.

La irrigación sanguínea del ovario proviene de las arterias uterina y ovárica, siendo la ovárica la de mayor importancia. Caudalmente, la arteria ovárica se anastomosa con la arteria uterina, considerándose a esta como una fuente suplementaria de sangre arterial al ovario. La importancia de conocer el recorrido y ubicación de estos vasos está dada por la relevancia de los mismos en la ovariectomía/ovariohisterectomía, una de las cirugías más frecuentes en clínica reproductiva de animales de compañía utilizada para evitar gestaciones no deseadas como así también prevenir y/o tratar enfermedades uterinas u hormonodependientes.

Los ovarios no son explorables mediante palpación abdominal salvo que se haya desarrollado una neoformación de tamaño considerable, lo cual hace que pueda palparse una masa en la región ovárica o zona adyacente durante la exploración. La ultrasonografía permite explorar los ovarios obteniéndose datos como el tamaño, forma, presencia de folículos, quistes o neoformaciones. Con un equipo apropiado puede realizarse el seguimiento de los folículos

ováricos hasta la ovulación. Un estudio laparoscópico o una laparotomía son otras dos metodologías utilizadas en la exploración ovárica si la condición del paciente lo amerita.

Trompas Uterinas

Las trompas uterinas u oviductos son dos estructuras tubulares pequeñas, de unos 5 a 8 cm de longitud, las cuales conectan a los ovarios con los cuernos uterinos (Sisson y Grossman, 1982). En ellas ocurre el transporte de gametas, la capacitación espermática, la segmentación embrionaria y el transporte sincronizado del embrión hacia el útero para su posterior nidación.

Los oviductos están formados por tres porciones, las cuales se denominan infundíbulo, ampolla e istmo. El infundíbulo es la extremidad ovárica de la trompa uterina, se encuentra localizado cerca de la abertura dentro de la bolsa ovárica y tiene unas estructuras que aumentan el área de superficie llamadas fimbrias, que son eversiones de la mucosa del infundíbulo, las cuales facilitan el deslizamiento del ovocito hacia el útero en el momento de la ovulación. El infundíbulo tiene una pequeña abertura, por la cual ingresa el óvulo dentro de la trompa uterina cuando se produce la ovulación y desemboca dentro del cuerno uterino a través del llamado agujero uterino. Los ovocitos se movilizan por la trompa uterina hacia el útero mediante movimientos peristálticos. La unión útero- tubárica previene el flujo retrógrado de fluido desde el útero hacia las trompas uterinas (Johnston y col., 2001).

Un estudio laparoscópico o una laparotomía son en la actualidad las dos metodologías que permiten explorar las trompas.

Útero

El útero se encuentra ubicado en la cavidad abdominal, dorsal al tracto urinario y ventral al tubo digestivo. Es una estructura tubular compuesta por dos cuernos, un cuerpo y un cuello o cérvix. Los cuernos, son dos estructuras de diámetro uniforme que divergen del cuerpo uterino, una hacia cada lado y en las cuales desembocan las trompas uterinas (Sisson y Grossman, 1982) (Foto 2). El cérvix se conecta con los cuernos y la vagina (Foto 3). En la perra, al igual que en la gata el cuerpo es corto y los cuernos son largos, característica que los diferencia de otras especies (Senger, 2003) (Foto 2).

El tamaño del útero no gestante varía con la especie, la raza, la edad y el tamaño del animal; así como también la etapa del ciclo estral y la ocurrencia de gestaciones previas. El tamaño y el peso aumentan en hembras maduras, así como en el proestro y estro. El peso uterino máximo se adquiere durante el diestro temprano en la hembra no gestante, y va decreciendo hasta que llega al anestro, etapa en donde adquiere su menor peso y tamaño. En

una perra de tamaño medio el cuerpo uterino mide 2 a 3 cm y los cuernos 12 a 15 cm de largo (Sisson y Grossman, 1982; Johnston y col., 2001). El cérvix, se encuentra situado dorsal a la vejiga. Está compuesto por músculo liso formando así el canal cervical, el cual tiene una longitud promedio de 1,5 a 2 cm. El cérvix canino puede protruir 0,5 a 1 cm dentro de la vagina pero mantiene una posición abdominal y puede ser palpable a través del abdomen solo durante el estro (Johnston y col., 2001).

El útero es el órgano en donde se implanta el embrión, luego de producirse la ovulación y posterior fecundación, allí se desarrolla la gestación hasta el momento en que se desencadena el parto.

El útero puede ser inspeccionado durante una laparotomía realizada por línea media. Los cuernos uterinos pueden palpase durante la exploración abdominal si ocurre aumento fisiológico o patológico del órgano. En hembras gestantes así como cuando existen coelcias uterinas o neoformaciones, puede detectarse y evaluarse el órgano a través de palpación abdominal. Algunos métodos complementarios utilizados para el diagnóstico por imágenes como la ecografía y radiografía permiten obtener datos sobre la estructura uterina útiles en la aproximación diagnóstica. La ultrasonografía permite la obtención de datos como tamaño y contenido uterino, grosor del endometrio, presencia de gestación y viabilidad fetal (Mattoon y Nyland, 2002). La radiología puede brindar datos importantes en algunos momentos reproductivos como el final de la gestación, momento en el cual permite determinar el número de cachorros gestados. Si bien la ecografía uterina, en la mayoría de los casos, permite obtener datos del órgano no observables en el estudio radiográfico, no debe olvidarse que la utilidad del método se encuentra íntimamente relacionada con el problema que presente cada paciente en particular. También se puede acceder al útero por vía endoscópica mediante canulación transcervical (Watts y Wright, 1995), sin embargo este método es dificultoso en la perra por la anatomía de la vagina craneal, la cual se describirá a continuación; y el cérvix, descrito anteriormente.

Vagina

Es el órgano copulatorio de la hembra y continúa el tracto reproductivo luego del cérvix. En la perra, la vagina es muy larga, tiene una porción caudal y una porción craneal mucho más estrecha. La vagina craneal está limitada en la parte anterior por el cérvix y el fórnix o fondo de saco. El fórnix ubicado en la porción craneoventral, es la parte más profunda de la vagina (Foto 3). La mucosa de la vagina forma pliegues longitudinales cuya imagen macroscópica varía en las diferentes fases del ciclo (Sisson y Grossman, 1982; Johnston y col., 2001). La vagina canina presenta un pliegue dorsal que dificulta la visualización del cuello uterino.

Vestíbulo Vaginal

El vestíbulo conecta la vagina con la abertura genital externa (labios vulvares) encontrándose en su piso, cerca de la unión vestíbulo-vaginal, el meato uretral externo, el cual contiene el orificio uretral externo. La unión vestíbulo-vaginal es un área estrecha y angular que en algunas perras presenta resistencia a ciertas maniobras como palpación digital o vaginoscopía, por ejemplo, en perras pequeñas, en anestro, prepúberes o con anomalías anatómicas (Sisson y Grossman, 1982; Johnston y col., 2001). La unión vestíbulo-vaginal durante el estro se encuentra relajada en la mayoría de las perras. En el tejido subepitelial del vestíbulo existen nódulos linfáticos, por lo cual la irritación de la mucosa por agentes químicos o microbianos induce hiperplasia e hiperemia de los nódulos linfáticos, lo cual puede ser evidente en la observación vaginoscópica o al tacto durante el examen vestibular (Johnston y col., 2001).

Vulva

Es uno de los órganos externos, presenta dos labios y dos comisuras. Los labios son gruesos y se unen hacia medial en dorsal y ventral formando las comisuras dorsal y ventral, respectivamente. La comisura ventral es puntiaguda. Se encuentra ubicada caudal al vestíbulo y cranealmente está limitada por la porción craneal de la fosa del clítoris (Johnston y col., 2001)

Clítoris

Es el órgano femenino homólogo al pene del macho, se encuentra ubicado en la fosa del clítoris, es relativamente pequeño y posee una base, un cuerpo y un glánde. El cuerpo es ancho y plano, de unos 3-4 cm de longitud en una hembra de talla media, está ricamente irrigado e innervado en su porción ventral lo que lo hace altamente sensible. No está compuesto por tejido eréctil. El glánde se encuentra situado dentro de la fosa clitorídea, ubicada ventral al vestíbulo, el mismo está compuesto de tejido eréctil y puede observarse cuando separamos los labios vulvares dentro de la fosa contiguo a estos. (Sisson y Grossman, 1982; Senger, 2003). Conocer la ubicación de la fosa del clítoris nos permite evitarla durante la toma de muestra de material para el estudio citológico vaginal, como así también evitarla cuando queremos cateterizar la uretra de una hembra, ya sea para tomar una muestra de orina estéril, medir la producción de orina, etc.

Glándulas mamarias

Las mamas o glándulas mamarias son glándulas cutáneas apócrinas, compuestas y modificadas, que presentan una estructura túbulo-alveolar. Se encuentran a cada lado de la línea media, de forma simétrica, y se extienden desde la región torácica ventral hacia la región inguinal. En la perra generalmente hay 5 pares de mamas distribuidas a los lados de la línea media. Según su localización las mamas se denominan, torácicas craneales, torácicas caudales, abdominales craneales, abdominales caudales e inguinales (Sisson y Grossman, 1982; Johnston y col., 2001). En algunas perras puede haber 4 o 6 pares mamarios. Los pezones son cortos y sus vértices poseen de 6 a 12 orificios pequeños, denominados conductos excretores.

Las glándulas mamarias torácicas, y abdominal craneal drenan al ganglio linfático axilar ipsilateral, mientras que la abdominal caudal y la inguinal drenan al ganglio linfático inguinal superficial ipsilateral. Sin embargo, existen comunicaciones linfáticas inconstantes entre la abdominal craneal y la abdominal caudal. De la misma manera se producen conexiones linfáticas entre torácica craneal, torácica caudal y abdominal craneal; como así también entre abdominal caudal e inguinal. Los vasos linfáticos que drenan mamas de ambas cadenas están en íntima relación, sin embargo, se ha determinado que no existe comunicación entre ellos (Stan y col., 2010). Conocer el drenaje linfático y las comunicaciones mamarias toma importancia a la hora de realizar una mastectomía asociada a la presencia de neoplasia mamaria, ya que las conexiones linfáticas de la mama afectada con las adyacentes determinan qué glándulas extirpar.

Las glándulas mamarias se exploran fácilmente mediante palpación, maniobra que permite obtener datos relevantes en el examen genital.

Hembra felina

Ovarios

En la gata doméstica, los ovarios son dos estructuras ovales, con una longitud media de 1 cm y 0,5 cm de ancho y un peso aproximado de 220 mg (Foto 4). Se encuentran ubicados en la región dorsal del abdomen, caudal a los riñones (Reighard y Jennings, 1901; Sisson y Grossman, 1982; Johnston y col., 2001). Al igual que en la hembra canina, los ovarios, las trompas uterinas y el útero, están suspendidos en la cavidad peritoneal por el ligamento ancho, un pliegue de peritoneo, el cual se subdivide en ligamento suspensorio del ovario, mesovario, mesosalpinx y mesometrio, en relación al órgano adyacente. Cada ovario está sujeto al diafragma por el ligamento suspensorio, a la pared abdominal dorsal por el mesovario y al cuerno uterino ipsilateral por un ligamento corto, el ligamento propio del ovario. El mesosalpinx, es un pliegue de peritoneo que se origina en el mesovario, envuelve a las trompas y pasa alrededor del ovario formando la bolsa ovárica, que a diferencia de la perra, en la gata, la bolsa es parcial. El mesometrio, es la porción de peritoneo que continúa al mesosalpinx, y es la estructura que mantiene a los cuernos uterinos y al cuerpo sujetos a la pared abdominal. Hay otro ligamento, el ligamento redondo del útero, que se extiende desde la pared abdominal, en el sitio anatómico correspondiente al anillo inguinal del macho, hasta el cuerno del útero, uniéndose al ligamento ancho (Reighard y Jennings, 1901; Johnston y col., 2001).

Trompas Uterinas y Útero

El oviducto de la gata presenta las mismas divisiones anatómicas que el oviducto de la perra. En la hembra adulta, posee una longitud de 5-6 cm.

El útero presenta forma de Y, con un cuerpo de aproximadamente 2 cm de longitud, y dos cuernos uterinos largos, de unos 10 cm de longitud, que conectan el cuerpo uterino con las trompas oviductales (Reighard y Jennings, 1901). La mucosa uterina presenta pliegues longitudinales.

El cérvix o cuello uterino es la porción del útero que se introduce dentro de la vagina, en dirección ventrocaudal y comunica la cavidad uterina con la cavidad vaginal. El mismo se encuentra aproximadamente 3,5 cm craneal a la vulva (Watson y Glover, 1993). El canal cervical se encuentra abierto durante el estro y cerrado en otras fases del ciclo estral.

El tamaño del útero varía con el tamaño, edad y número de pariciones de la gata, así como también con la etapa del ciclo estral y tiempo de preñez. En hembras felinas adultas vacías, el peso uterino es aproximadamente de 1,5 g (Johnston y col., 2001).

Vagina

Se extiende desde el cérvix al himen, que se encuentra justo craneal al orificio uretral externo, en el vestíbulo o seno urogenital. Posee una longitud aproximada de unos 2 cm. En hembras preñadas la vagina se estrecha cranealmente por el peso del útero (Johnston y col., 2001). Su mucosa presenta pliegues longitudinales y su aspecto varía con la etapa del ciclo estral. En hembras inmaduras o en anestro el epitelio vaginal es cúbico bajo, con una capa superficial celular; en proestro el epitelio es escamoso estratificado, con 15 a 20 capas de células. Al final del estro, el epitelio va decreciendo gradualmente, disminuye el número de capas celulares, por lo cual pasa de ser estratificado alto a estratificado bajo, hasta que se convierte en columnar después del estro y pueden observarse leucocitos polimorfonucleares entre las capas epiteliales y el lumen. La pared vaginal está formada por capas musculares, la circular interna es gruesa y la longitudinal externa delgada. (Johnston y col., 2001). La vagina felina sufre ligeras modificaciones anatómicas durante las diferentes etapas del ciclo estral (Zambelli y col., 2004).

Vestíbulo

El seno urogenital o vestíbulo, se extiende desde el orificio uretral externo hacia caudal, y su longitud media es de 2 cm (Watson y Glover, 1993; Johnston y col., 2001). El orificio uretral externo se encuentra en el piso del vestíbulo, justo caudal a un pliegue de mucosa transversa, el himen. El vestíbulo presenta un epitelio estratificado escamoso. La pared vestibular se encuentra rodeada por un músculo estriado, el constrictor vestibular. En las paredes laterales del vestíbulo, se encuentran distribuidas irregularmente las glándulas vestibulares mayores o glándulas de Bartholin, las cuales producen un mucus que se libera al lumen vestibular, ventrolateralmente a través de conductos permitiendo así la lubricación de la mucosa vestibular. Las glándulas vestibulares menores vacían su contenido en el piso del vestíbulo (Johnston y col., 2001).

Clítoris

Al igual que en la hembra canina, se encuentra localizado en el piso de la fosa clitorídea, ubicada ventral al vestíbulo. En la gata, el clítoris puede contener un pequeño cartílago (Johnston y col., 2001).

Vulva

Se encuentra ventral al ano. Presenta dos pequeños labios laterales que se unen en ventral y dorsal formando las comisuras vulvares, ventral y dorsal (Foto 5). Los labios son más pequeños en hembras castradas que en hembras enteras.

Glándulas Mamarias

La gata posee cuatro pares de glándulas mamarias, distribuidas en dos hileras a los laterales de la línea media, desde la región torácica ventral a la región abdominal ventral. Las mismas se denominan en base a su localización anatómica como glándulas mamarias torácica craneal y caudal, abdominal e inguinal. Así mismo, se les puede designar un número a cada par, desde craneal a caudal, siendo así, el 1° par, el torácico craneal, y el 4° par, el inguinal (Foto 6). El drenaje linfático es homólogo al de la perra, los dos pares craneales drenan hacia el nódulo linfático axilar, y los dos pares caudales drenan hacia el nódulo linfático inguinal superficial. Habitualmente no hay conexiones entre las glándulas mamarias craneales y las glándulas mamarias caudales, tampoco hay comunicación lateral entre los pares de la línea derecha y la línea izquierda (Johnston y col., 2001).

Bibliografía

- Johnston, S.D.; Root Kustritz, M.V.; Olson, P.N.S. (2001). *Canine and feline theriogenology*. (1st ed.). Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- Mattoon, J.S.; Nyland, T.G. (2002). "Ovarios y Utero". En *Diagnóstico ecográfico en Pequeños Animales*. (pp.240-259). 2da ed. Barcelona, España: W.B.S. Company.
- Reighard, J.; Jennings, H.S. (1901). "The viscera: Urogenital System". En *Anatomy of the cat*. (pp.263-268). New York: Henry Holt and Company.
- Senger, P.L. (2003). "The Organization and Function of the Female Reproductive System". En *Pathways to pregnancy and parturition*. (pp.9-43). Second Revised Edition. Pullman, Washington: Current Conceptions, Inc. Washington State University.
- Sisson, S.; Grossman, J.D. (1982). "Aparato urogenital de los carnívoros". En *Robert Getty Anatomía de los animales domésticos*. (pp.1728-1741). (5ta ed.). Barcelona: Salvat Editores, S.A.
- Stan, F.; Gudea, A.; Chirilean Ioana, Damian, A.; Papuc, I.; Dezdrobotu, C.; Ileana Bochiș. (2010). "Identifying the lymphatic vascular model of the mammary gland in bitches". *Lucrări Stiințifice Medicina Veterinară, XLIII* (2), pp. 356-363.
- Watson, P.F.; Glover, T.E. (1993). "Vaginal anatomy of the domestic cat (*Felis catus*) in relation to copulation and artificial insemination". *J Reprod Fertil Suppl* 47, pp. 355-9.
- Watts, J.R.; Wright, P.J. (1995). "Investigating uterine disease in the bitch: uterine cannulation for cytology, microbiology and hysteroscopy". *J Small Anim Pract* 36 (5), pp. 201-6.
- Zambelli, D.; Buccioli, M.; Castagnetti, C.; Belluzzi, S. (2004). "Vaginal and Cervical Anatomic Modifications During the Oestrus Cycle in Relation to Transcervical Catheterization in the Domestic Cat". *Reprod Dom Anim* 39, pp. 76-80.



Foto 1: Ovario de perra visualizado luego de realizar una incisión en la bolsa ovárica.

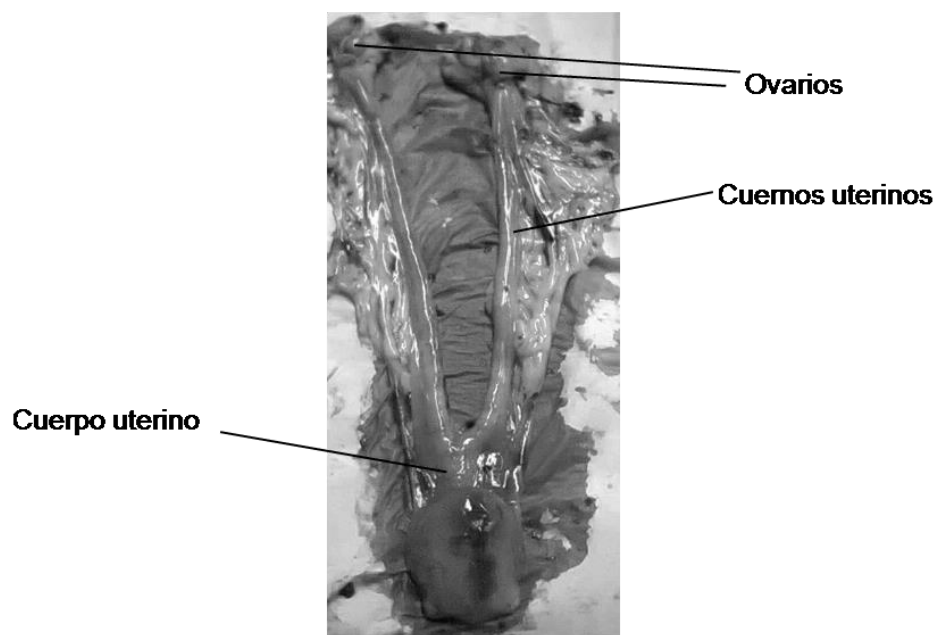


Foto 2: Útero y ovarios de perra.

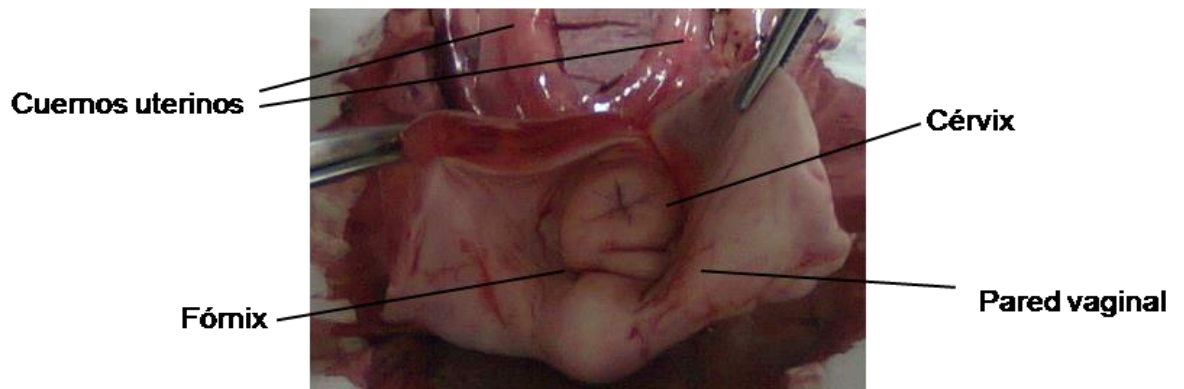


Foto 3: Cérvix y fondo de vagina de la perra.

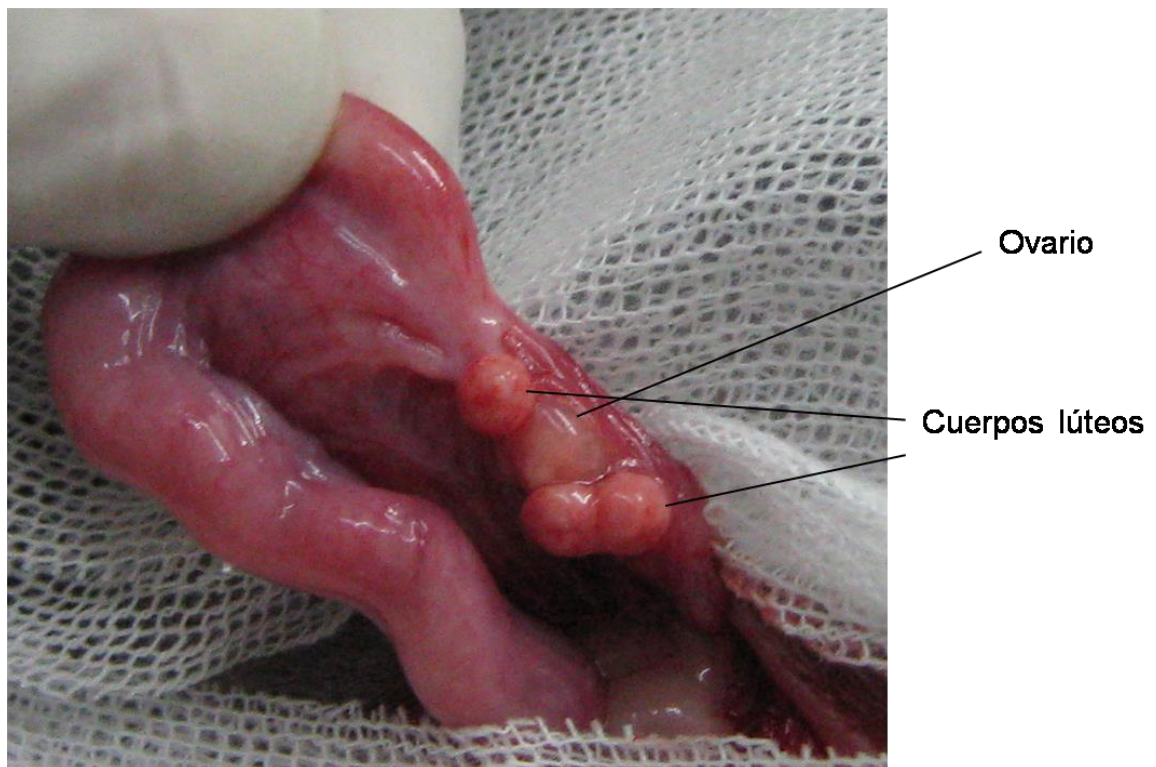


Foto 4: Ovario de gata con cuerpos lúteos.

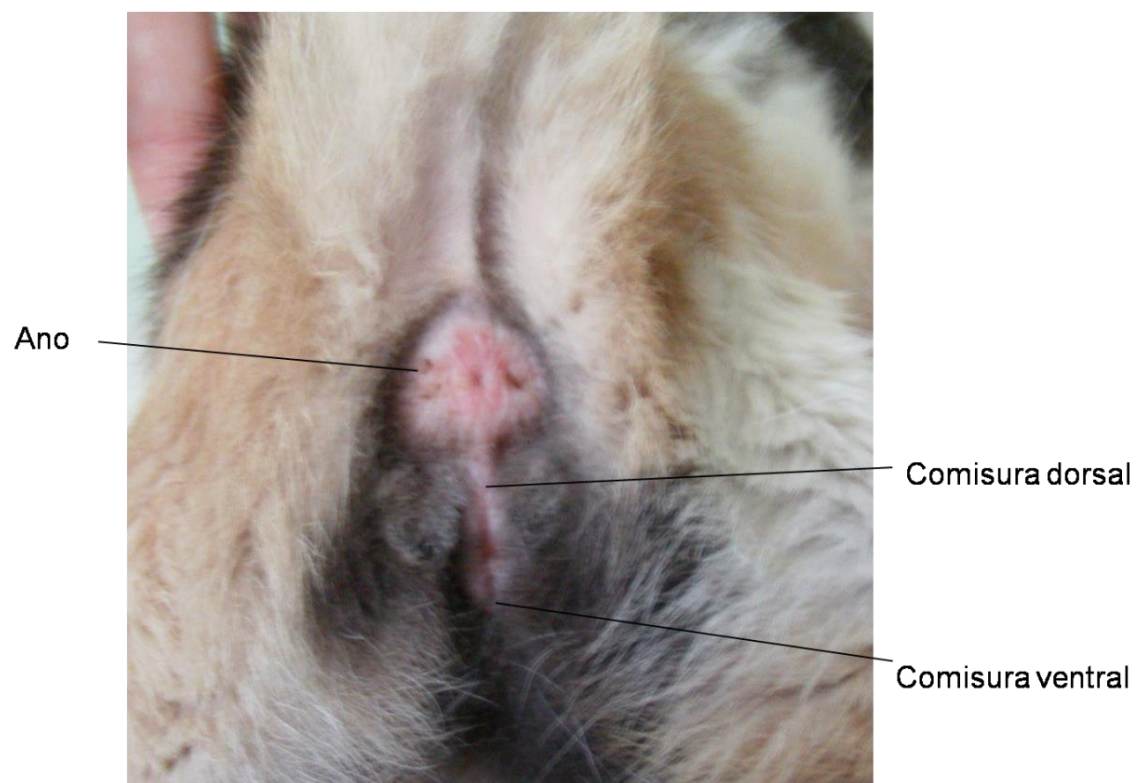


Foto 5: Vulva de gata.

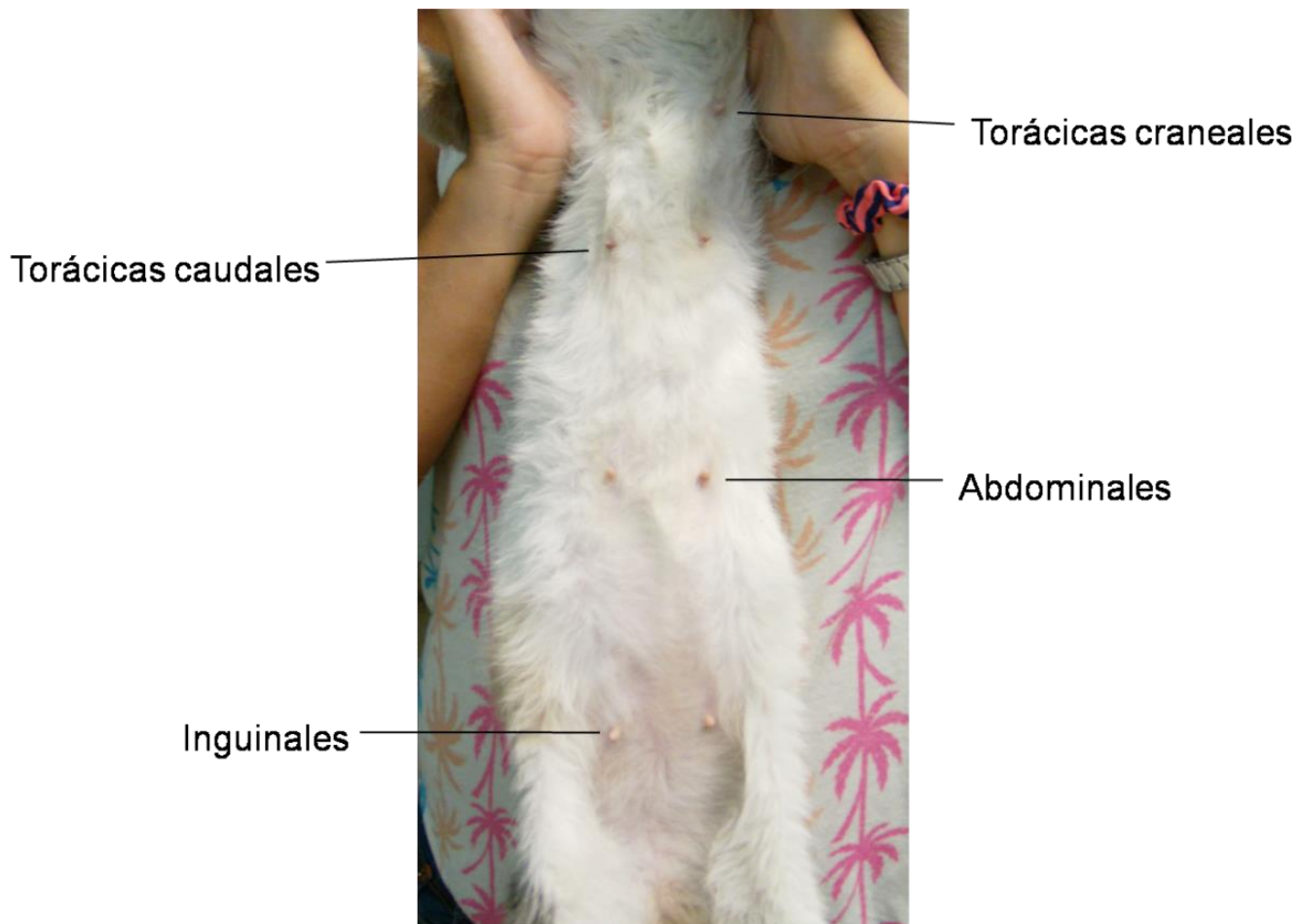


Foto 6: Glándulas mamarias de la gata.

CAPÍTULO 2

Anatomía del aparato genital masculino

Romina Gisele Praderio

Macho canino

El tracto genital del macho canino está compuesto por los siguientes órganos reproductivos: escroto, testículos, epidídimo, conducto deferente y cordón espermático, pene, prepucio y próstata; los mismos serán descriptos a continuación.

Escroto

Es una bolsa membranosa, delgada, que se encuentra entre la región inguinal y el ano, envolviendo a los testículos y epidídimos. Su función es de sostén, protección y termorregulación de testículos y epidídimos (Senger, 2003). El mismo está formado por piel, la cual se encuentra pigmentada y cubierta por escasos pelos finos. Está dividido por un septo medio en dos cavidades, las cuales alojan a los testículos, epidídimo y parte distal del cordón espermático. Por debajo de la piel, se encuentran glándulas sebáceas, bien desarrolladas y una capa de músculo liso pobremente definida, con fibras elásticas y colágeno, llamado dartos. Los testículos están rodeados por la túnica vaginal, la cual se forma por una evaginación del

peritoneo cubierto por la fascia espermática de la pared abdominal, llamado proceso vaginal (Johnston y col., 2001). La túnica vaginal está compuesta por dos capas, una superficial, llamada capa parietal de la túnica vaginal, y otra más interna, que es la capa visceral de la túnica vaginal. El espacio que se encuentra entre ambas capas se denomina, cavidad del proceso vaginal. Otra de las estructuras que se encuentran dentro del escroto es el músculo cremáster, que es un músculo estriado, que se origina del músculo abdominal oblicuo interno y se inserta en la capa parietal de la túnica vaginal. Junto con el dartos, el cremaster, mediante su contracción y relajación, permite el movimiento del escroto en relación al cuerpo, ya que se contrae en respuesta a bajas temperaturas y se relaja cuando las mismas son elevadas. Este movimiento, la piel delgada con escasos pelos y la presencia de glándulas sebáceas son atributos que le otorgan al escroto la función de termorregulador para los testículos y epidídimos (Johnston y col., 2001). Además de esta importante función de termorregulación, el escroto actúa de capa protectora de los órganos que aloja, como se dijo anteriormente.

La exploración del escroto se realiza mediante inspección directa evaluando su aspecto, color, presencia de neoformaciones e integridad y mediante palpación directa, evaluando temperatura, sensibilidad, textura, consistencia y cualquier otra característica que pueda indicar alteración del mismo.

Testículos

Son dos estructuras ovales situadas entre los miembros posteriores dentro del escroto, con un tamaño que varía con el peso corporal del animal. Presentan su eje mayor anteroposterior en posición oblicua y en dirección dorsocaudal (Sisson y Grossman, 1982; Johnston y col., 2001). Cada uno de los testículos posee un polo craneal y un polo caudal y dos caras, una lateral y una medial. Son considerados los órganos reproductores primarios del macho por su función, ya que en ellos se producen los espermatozoides y la testosterona. También son productores de otras hormonas como la inhibina y estrógenos; proteínas, necesarias para la función espermática; y fluido que actúa como vehículo para los espermatozoides (Senger, 2003).

El testículo está cubierto por la túnica albugínea, que es un tejido fibroso denso que encapsula al testículo, y por la capa visceral de la túnica vaginal. En el polo craneal del testículo, la túnica albugínea se une al mediastino testicular, un cordón de tejido conectivo de 0,2cm de ancho, que recorre el centro del testículo, a través de su longitud axial (Johnston y col., 2001).

El mediastino testicular da origen a un tabique de tejido conectivo que divide al testículo en pequeños lóbulos incompletos. Estos lóbulos contienen a los túbulos seminíferos, los cuales conectan con túbulos rectos que desembocan en la rete testis del mediastino testicular y ésta

drena a los conductos deferentes que se conectan a la cabeza del epidídimo (Sisson y Grossman, 1982).

Como se mencionó anteriormente, los testículos son los órganos reproductivos de mayor importancia en el macho debido a su función. Es por ello que debe hacerse una buena evaluación de los mismos tanto en las consultas reproductivas como en las clínicas. Los mismos deben inspeccionarse evaluando tamaño, forma, consistencia, temperatura y sensibilidad. Es importante evaluar la relación testículo-epidídimo (órgano que se examina en conjunto con el testículo), deben palpase ambos testículos dentro de la bolsa escrotal, si esto no ocurre pasado el tiempo de descenso testicular podríamos estar frente a un individuo criptórquido. Como método complementario para examinar a los testículos podemos utilizar la ultrasonografía, la misma nos aporta datos sobre la ecogenicidad y ecotextura del tejido testicular, permitiendo aproximar el diagnóstico de diversas patologías testiculares. Así mismo la ultrasonografía resulta útil en la toma de muestra de biopsia testicular ecodirigida.

Epidídimo

Es una estructura alargada, que se encuentra ubicada sobre la superficie dorsolateral del testículo, pudiendo diferenciarse en ella tres porciones anatómicas, la cabeza, el cuerpo y la cola. Su cabeza está posicionada en el polo craneal del testículo, iniciándose en medial y dirigiéndose hacia lateral para continuar con el cuerpo, el cual recorre la superficie dorsolateral, y la cola, la cual se encuentra sujeta a la porción caudal del testículo por el ligamento propio del testículo (Johnston y col., 2001; Constantinescu, 2007). La función del epidídimo es proveer a los espermatozoides el medio ambiente necesario para su maduración, otorgándoles motilidad y potencial de fertilidad; además de ser el reservorio de los mismos (Senger, 2003).

La evaluación de este órgano se realiza en conjunto con la evaluación del testículo. Se procede con la inspección y palpación del mismo, recolectando datos de ambas.

Cordón espermático

Es una estructura con forma de cordón que se extiende desde el anillo inguinal profundo hasta el borde de inserción en el testículo, pasando a través del canal inguinal en dirección oblicua hacia ventral (Nickel y col., 1979; Sisson y Grossman, 1982; Johnston y col., 2001).

Está formado por una serie de componentes: arteria y venas testiculares, el plexo pampeniforme, vasos linfáticos, plexo testicular de nervios autónomos, conductos deferentes, arteria y vena del conducto deferente, haces de tejido muscular liso alrededor de los vasos y la capa visceral de la túnica vaginal.

La función de este cordón es proveer conexión vascular, linfática y neural entre el cuerpo y el testículo, permitir el intercambio de calor y contener al músculo cremáster (estructura que permite acercar o alejar al testículo del cuerpo cumpliendo una importante función en la termorregulación del órgano) (Senger, 2003).

Conducto deferente

Es un conducto tubular que se encuentra a continuación de la cola del epidídimo. Al comienzo es un conducto flexuoso y corre a lo largo del borde epididimal del testículo, de polo caudal a polo craneal, luego pasa sobre la cabeza del epidídimo y forma parte del cordón espermático dirigiéndose hasta el anillo vaginal. Dentro del abdomen, el conducto deferente realiza una curva y se dirige hacia dorsocaudal para ingresar a la cavidad pelviana, llegando así a la uretra, donde penetra la glándula prostática y libera su contenido a los laterales de los colículos seminales (Johnston y col., 2001).

En el perro, este conducto presenta una estructura en forma de ampolla, denominada, ampolla del conducto deferente.

Pene

El pene es el órgano copulatorio del macho. El mismo está compuesto por una raíz, un cuerpo y un glande. Para describir su composición vamos a dividirlo anatómicamente en proximal o caudal y en distal o craneal.

En su parte proximal, a nivel de la raíz presenta dos cuerpos cavernosos separados por un tabique medio (Sisson y Grossman, 1982) y está rodeado por la túnica albugínea gruesa y el músculo isquiocavernoso. La raíz peneana está adherida al arco isquiático entre las tuberosidades isquiáticas. El cuerpo presenta dos cuerpos eréctiles separados por un septo medio de tejido conectivo y se inicia en el sitio de unión de los dos pilares (Johnston y col., 2001). Dentro del cuerpo del pene, en su parte ventral, se aloja la uretra, la misma está rodeada por el cuerpo esponjoso. La porción distal del pene está compuesta por el glande. El glande posee dos porciones anatómicas, la proximal es el bulbo del glande, que es una expansión del tejido esponjoso y la más distal y última porción del pene es la pars elongada, la cual es cilíndrica y presenta un extremo libre puntiagudo (Johnston y col., 2001). Ambas porciones están provistas de tejido eréctil (Sisson y Grossman, 1982). El pene del macho canino presenta a diferencia de otras especies un hueso peneano, el os penis, que corre a través del glande, tanto a nivel del bulbo, al cual está muy adherido, como a nivel de la pars elongada. En perros grandes, este hueso puede alcanzar una longitud aproximada de 10 cm y

se encuentra por encima del recorrido de la uretra. El os penis es convexo dorsalmente y en su cara ventral presenta un surco en el cual se aloja la uretra. El hueso del pene se relaciona con los cuerpos cavernosos hacia caudal. En su porción craneal es más pequeño y curvado y posee una prolongación de cartílago hialino en perros jóvenes, la cual se fibrosa en animales adultos (Sisson y Grossman, 1982).

La evaluación clínica de este órgano se inicia con la inspección de la mucosa, para lo cual debemos exteriorizarlo, corriendo la piel del prepucio hacia caudal. Una vez expuesta la mucosa peneana, debemos evaluar su color, grado de hidratación, presencia de neoformaciones, cuerpos extraños, inflamación y laceraciones. Es importante exteriorizar el pene completamente para visualizar tanto la parte larga como el bulbo del glande, en donde muchas veces se aloja el TVT, el cual puede diagnosticarse fácilmente haciendo una buena maniobra o por el contrario, pasar desapercibido si hacemos una mala inspección. Del mismo modo la palpación aporta datos importantes, debe hacerse cuidadosamente y siguiendo las mismas pautas que en el resto de los órganos.

Prepucio

El prepucio es una vaina de piel que envuelve al pene en su parte distal (glande). Presenta una lámina externa y una interna. La lámina interna se encuentra adherida al bulbo del glande. A nivel del fórnix, la mucosa prepucial se continúa como mucosa peneana.

Próstata

La próstata es la única glándula accesoria presente en el macho canino. Está compuesta por dos lóbulos, derecho e izquierdo, divididos por un septo medio fibroso (Sisson y Grossman, 1982; Johnston y col., 2001). Se encuentra cubierta por una cápsula gruesa que en su composición contiene músculo liso al igual que el estroma. Se aloja alrededor del cuello de la vejiga, en la unión de ésta con la uretra, a la altura del borde craneal del pubis. Dorsalmente se relaciona con el recto y ventralmente con la sínfisis púbica o la pared abdominal ventral, dependiendo de su tamaño, ya que al aumentar el tamaño de la glándula, esta se desplaza hacia craneal.

Presenta numerosos conductos prostáticos, los cuales vacían su contenido en la uretra prostática, cerca de la abertura de los conductos deferentes, formando así los colículos seminales. Su tamaño y peso varían con la edad y con la estimulación hormonal, ya que es un órgano andrógeno dependiente. El mismo va incrementándose en peso y tamaño hasta los 11

años, y luego, en la etapa senil involuciona (Johnston y col., 2001), siendo mayor en un paciente geronte sexualmente activo y sufriendo un proceso de atrofia en machos castrados.

La próstata puede ser evaluada durante el examen clínico por palpación directa mediante tacto rectal, introduciendo un dedo enguantado a través del recto. Mediante esta maniobra podemos palpar los dos lóbulos divididos por una depresión, el septo medio, y nos aporta datos sobre forma, consistencia y tamaño de la glándula. Para aproximar el diagnóstico de las afecciones de la glándula debemos recurrir a métodos complementarios como la ultrasonografía, radiología y examen de la tercera fracción del eyaculado, entre otros.

Macho Felino

Testículos

Al igual que en el perro, el macho felino presenta un par de testículos alojados en la zona perineal cubiertos por la bolsa escrotal. Los mismos poseen forma esférica y un tamaño de aproximadamente 1,5 x 1.0 x 1.0 cm (Johnston y col., 2001). En el gato adulto, el peso y el volumen testicular varían dependiendo la estación de año, aumentando en la estación reproductiva (Blottner y Jewgenow, 2007; Praderio y col., 2012). El volumen testicular se puede calcular aplicando la fórmula de la elipse elongada a partir de la longitud, ancho y alto testicular. En un trabajo realizado en 2012 se demostró que había una tendencia a ser mayor durante la estación reproductiva, aunque deberían hacerse más estudios para confirmarlo (Praderio y col., 2012).

Epidídimo, conducto deferente y cordón espermático

El epidídimo está compuesto por la cabeza, el cuerpo y la cola. La cabeza del epidídimo se localiza en la superficie dorsocraneal del testículo, en su cara medial, el cuerpo se dirige hacia dorsolateral hasta llegar al polo caudal continuándose con la cola del epidídimo (Axner, 1999).

Los conductos deferentes son la continuación del conducto epididimario. A diferencia del perro, en el gato no se encuentra la ampolla del conducto deferente.

El cordón espermático en el macho felino está compuesto por el conducto deferente, vasos linfáticos, vena y arteria testicular y el plexo nervioso testicular al igual que en las otras especies. La vena testicular, se origina desde un plexo venoso, el plexo pampiniforme, el mismo se encarga de regular la temperatura testicular, y junto con el músculo cremaster y el escroto actúan como termoreguladores (Johnston y col., 2001; Senger, 2003).

Próstata

La próstata del gato doméstico es un órgano compuesto por cuatro lóbulos esféricos, dos craneales y dos caudales, de aproximadamente 1 cm de longitud que cubre a la uretra dorsal y lateralmente sobre el cuello de la vejiga (Johnston y col., 2001). Al igual que en otras especies, esta glándula es un órgano andrógeno-dependiente, por lo cual se atrofia luego de una orquiectomía.

Glándulas Bulbouretrales

A diferencia del macho canino, el gato doméstico presenta glándulas bulbouretrales. Las mismas poseen un tamaño de unos 5 mm de diámetro, forma de arveja y se encuentran ubicadas caudal a la próstata, dorsolateral al bulbo del pene en la sínfisis isquiática. Liberan su contenido en la uretra, a la altura de la raíz del pene a través de conductos simples (Reighard y Jennings, 1901; Johnston y col., 2001).

Pene

El pene en el macho felino, se encuentra ubicado en la región perineal, ventral al escroto. Está compuesto por dos cuerpos cavernosos y un cuerpo esponjoso. El cuerpo esponjoso está formado por tres porciones anatómicamente: la raíz, el cuerpo y el glande. El glande es una estructura cónica, de unos 5 a 10 cm de longitud que contiene espículas corneas, las mismas

se encuentran en un número de 120 a 150 dispuestas en 6 a 8 hileras (Aronson y Cooper, 1967; Johnston y col., 2001). Estas estructuras son andrógeno-dependientes, por lo cual están presentes en machos enteros y ausentes en machos prepúberes y castrados (Foto 1 y 2). Luego de la orquiectomía las espículas sufren un proceso de atrofia. La función de las espículas en la cópula estaría relacionada con la estimulación de la vagina de la hembra durante el coito, ya que las gatas poseen ovulación inducida.

Bibliografía

- Aronson, L.R.; Cooper, M.L. (1967). "Penile spines of the domestic cat: their endocrine-behavior relations". *Anat Rec* 157 (1), pp. 71-78.
- Axner, E.; Malmqvist, M.; Linde-Forsberg, C.; Rodriguez-Martinez, H. (1999). "Regional histology of the ductus epididymidis in the domestic cat". *J Reprod Dev* 4, pp. 151-160.
- Blottner, S.; Jewgenow, K. (2007). "Moderate seasonality in testis function of domestic cat". *Reprod Domest Anim* 42 (5) pp. 536-40.
- Constantinescu, G.H. (2007). "Chapter 2: Anatomy of Reproductive Organs. The Genital Apparatus in the Carnivore". En: Schatten, H.; Constantinescu, G.M. *Comparative Reproductive Biology*. (1st ed). Estados Unidos: Blackwell Publishing.
- Johnston, SD.; Kustritz, M.V.; Olson, P.N.S. (2001). *Canine and Feline Theriogenology*. (1st ed). Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- Nickel, R.; Schummer, A.; Seiferle, E. (1979). "Male Genital Organs of the Carnivores". En: *The Viscera of the Domestic Mammals*. (p. 324-329). Second revised edition. Germany: Springer.
- Praderio, R.G.; Bonaura, M.C.; Nuñez Favre, R.; Stornelli, M.A. (2012). "Estacionalidad Reproductiva en el gato doméstico". Actas del XIV congreso y 11avas Jornadas de Educación. Sociedad de Ciencias Morfológicas de La Plata (pp. 24). La Plata.
- Reighard, J.; Jennings, H.S. (1901). "The viscera: Urogenital System". En *Anatomy of the cat*. (pp. 263-268). New York: Henry Holt and Company.
- Senger, P.L. (2003). "Chapter 3. The organization and function of the male reproductive system". En: *Pathways to Pregnancy and Parturition*. Second Revised Edition. Pullman, Washington: Current Conceptions, Inc.
- Sisson, S.; Grossman, J.D. (1982). "Aparato urogenital de los carnívoros". En: Robert Getty *Anatomía de los animales domésticos*. (p.1728-1741). Quinta Edición. Barcelona: Salvat Editores, S.A.



Foto 1: Pene felino sin espículas.

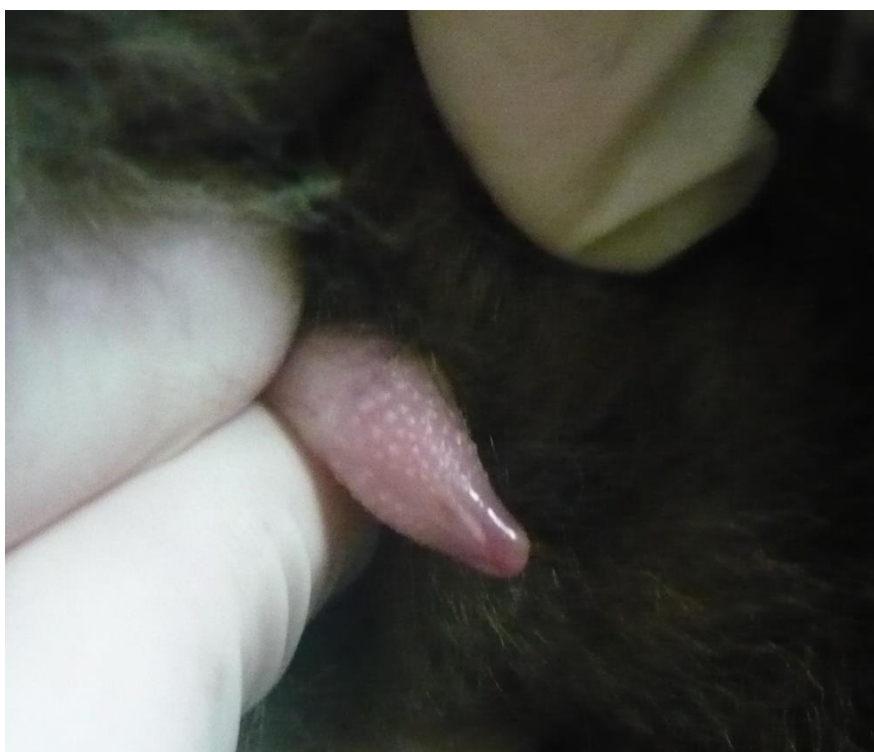


Foto 2: Pene felino con espículas

PARTE II

Fisiología reproductiva

*María Candela Bonaura, María Carla García Mitacek,
Romina Nuñez Favre, María Alejandra Stornelli, María Cecilia
Stornelli*



CAPÍTULO 3

Ciclo estral canino

María Cecilia Stornelli

Introducción

Puede definirse a la perra como monoéstrica, no estacional, politoca, con ovulación espontánea, con una fase lútea de larga duración seguida de un anestro obligado (Concannon, 2011).

Si se compara a los caninos con otros animales domésticos, se puede observar que la perra posee varias características reproductivas que la distingue de otras especies y que pasaremos a describir:

La perra es monoéstrica con escasa o nula estacionalidad (Hoffman y col., 1996). Luego de la ocurrencia del ciclo estral se produce un período de anestro de duración variable lo que da como resultado un intervalo entre los ciclos que puede oscilar entre 5 y 12 meses.

El período de proestro y comportamiento de estro es prolongado y variable (3-20 d), el inicio del comportamiento de estro puede ser tan temprano como 5 d antes de la ovulación o tan tardío como 3 d después.

La ovulación ocurre 2 d después del pico de LH. La hembra canina, a diferencia de otras especies, ovula ovocitos primarios que tardarán 2 o 3 d en madurar en el oviducto momento en el cual podrán ser fecundados es decir aproximadamente 4 d después del pico preovulatorio de LH.

En contraste a lo que ocurre en otras especies domésticas, la función lútea es prácticamente igual en la perra preñada que en la vacía, con la única diferencia que en la perra preñada la P_4 retorna a niveles basales en forma abrupta inmediatamente antes del parto mientras que en la perra vacía decrece paulatinamente durante el final del diestro (Hoffman y col., 1996). En esta especie no existe un mecanismo luteolítico por lo tanto la P_4 permanecerá elevada durante la fase lútea en la hembra vacía, aproximadamente 75 d. No se han identificado gonadotrofinas ni P_4 de origen placentario que sean secretadas durante la gestación y los esteroides sexuales son enteramente de origen ovárico. La liberación feto-placentaria de PGF induce la luteólisis pre parto (Concannon, 2009). Por otra parte, en la perra no gestante, la larga duración de la fase lútea resulta en agrandamiento mamario.

En las perras al final del diestro y en concordancia con el descenso de la concentración de P_4 a niveles basales sin descenso de la concentración sérica de PRL, puede ocurrir desarrollo mamario con secreción láctea y cambios de conducta, condición clínica denominada pseudopreñez clínica (Concannon, 2011).

La fisiología reproductiva particular de la perra doméstica hace necesario un acabado conocimiento del ciclo estral y del período periovulatorio para poder realizar un correcto manejo reproductivo, una adecuada implementación de la inseminación artificial así como el diagnóstico y tratamiento de enfermedades relacionadas con la reproducción (Concannon, 2003). Estos hechos han impulsado a los investigadores a estudiar extensamente la biología reproductiva de la hembra canina en los últimos años (Concannon y col., 1989; Johnston y Romagnoli 1991; Noakes y col., 2001).

Estacionalidad

Como se mencionó anteriormente, la perra puede clasificarse como monoéstrica no estacional lo cual significa que solo ocurrirá un estro por ciclo y que el mismo no es estacional ya que la perra podrá ciclar en cualquier momento del año independientemente de la estación (Sokolowski, 1977). Esto da como resultado la ocurrencia de camadas a lo largo de todo el año. Si bien el perro doméstico (*canis lupus familiaris*) y el dingo junto con otras seis subespecies del lobo gris muestran estacionalidad reproductiva, la perra doméstica a diferencia de otras especies de *canis lupus*, ha perdido la fotoperiodicidad reproductiva observada en los cánidos silvestres (Concannon, 2009). Algunos autores discuten un aumento estacional de la actividad sexual en correlación a lo que ocurre en otros cánidos como el zorro, el coyote, el perro salvaje y el perro basenji africano, que ciclarán solo una vez por año y la estación reproductiva dependerá del hemisferio en el que habiten (Johnston y col., 2001; Jochle y Andersen, 1977). La actividad sexual estacional ligeramente aumentada durante el período primavera-verano podría ser el resultado de algunos elementos ambientales que estimulan el eje hipotálamo-hipófisis-ovario. Sin embargo al estudiar los establecimientos de cría puede observarse que en

los mismos las pariciones dependen de factores genéticos y de manejo, ya que existe una preferencia de los criadores para que las camadas nazcan cuando mejoran las condiciones ambientales, relacionándose también con las preferencias que establece el mercado de venta de cachorros. Es así que los picos de parición tienden a ocurrir hacia fines del año (diciembre) en el hemisferio sur, mientras que son más tempranos (julio) en el hemisferio norte. Es por todo esto que para evaluar los patrones estacionales del ciclo estral de la perra se debe considerar la compleja interacción de factores genéticos, climáticos y de manejo (Feldman y Nelson, 1987). En relación a lo anteriormente discutido diferentes estudios realizados han demostrado que el medio ambiente, puede influir en la estacionalidad del ciclo estral, pero que esta influencia es escasa en la perra doméstica. Diversos trabajos donde se evaluaron varios criaderos demostraron que los nacimientos de cachorros ocurren en todos los meses del año (Fosberg y Wallen, 1992).

Pubertad

La pubertad puede definirse como el momento a partir del cual un individuo es capaz de reproducirse. En la perra la pubertad puede reconocerse por el comienzo del primer proestro. El inicio de la pubertad se correlaciona con el momento en que la perra alcanza la talla de adulto. Por lo tanto puede ocurrir entre los 6 y 10 meses en las perras de talla pequeña, mientras que en las de talla grande puede demorarse hasta aproximadamente los dos años (Sokolowski., 1977). La madurez sexual o máxima capacidad reproductiva puede ser alcanzada recién en el segundo, tercer o cuarto celo (Feldman y Nelson., 1987; Johnston y col., 2001). La duración y las características del proestro y el estro pueden diferir entre las perras púberes y maduras. Es probable que las perras púberes demuestren un comportamiento de estro menos manifiesto durante la ovulación pudiendo ser menor la duración del proestro y el estro (Wildt y col., 1981). Así mismo se ha comunicado que en algunos ciclos de perras púberes, los patrones de E_2 , LH y P_4 fueron irregulares (Johnston y col., 2001, Wildt y col., 1981). Por otra parte las perras púberes pueden manifestar celo fragmentado con mayor frecuencia, durante el cual la hembra mostrará algunos signos verdaderos de proestro-estro, como descarga vulvar serosanguinolenta, edema vulvar, atracción del macho y en algunos casos pueden ser receptivas. Sin embargo no ocurre ovulación y a los pocos días los signos regresan hasta que el estro verdadero comienza luego de varios días o semanas. No ocurrirá la ovulación durante la primer mitad o falso celo, pero si en el celo verdadero, y si se le da servicio en el momento adecuado puede ocurrir concepción (Feldman y Nelson, 1987). Las perras púberes, más frecuentemente que las adultas, mostrarán celos silentes, durante los cuales ocurrirá ovulación pero en ausencia de comportamiento o signos clínicos notables de proestro-estro (Johnston y col., 2001).

Estadios del ciclo estral canino

Hace más de 100 años Heape describió los estadios clásicos del ciclo estral canino (Johnston y col., 2001). Sin embargo como este hecho fue anterior a la comprensión de los mecanismos hormonales, dicha clasificación solo se basó en la fisiología y comportamiento sexual de la hembra canina. En la actualidad el ciclo reproductivo de la perra doméstica (*canis lupus familiares*), puede describirse en base a los cambios de comportamiento, clínicos, fisiológicos, citológicos y endocrinológicos ocurridos en ella. El mismo incluye cuatro estadios: proestro, estro, diestro y anestro, considerándose como día cero del ciclo al pico pre-ovulatorio de LH (Concannon., 2011). La duración del intervalo interestral es variable pudiendo oscilar entre 4 a 10 meses con un promedio de 7 meses. Existen diferencias entre perras de una misma raza y entre diferentes razas (Sokolowski., 1977). Si bien las hembras de talla pequeña tienden a tener más ciclos estrales por año que las de talla grande, esto no siempre ocurre, ya que el ovejero alemán tendrá más ciclos estrales por año que el Boston Terrier (Johnston y col., 2001, Sokolowski., 1971). Los intervalos interestrales más frecuentes que cada 4 meses se asocian con infertilidad y los que demoran más de 11 meses con subfertilidad. Las razas caninas africanas como el Basenji ciclan una vez por año siendo las únicas razas que poseen un intervalo interestral normal de más de 11 meses (Feldman y Nelson, 1987). Diferencias en la duración del anestro entre diversas razas y dentro de una raza, entre diversas familias indica una base genética en las variaciones de los intervalos interestrales (Okkesns y Kooistra, 2006). La heredabilidad del intervalo interestral ha sido estimada en un 35% (Johnston y col., 2001). Así en perros Collies por ejemplo, el intervalo interestral es de aproximadamente 36 semanas y en Ovejeros Alemán es de 20 semanas (Okkens y Kooistra, 2006). Los factores ambientales pueden también afectar la duración del intervalo interestral, así una perra en anestro acortará su intervalo interestral si se la ubica en las proximidades de una en estro debido al efecto estimulador de las feromonas (Okkens y Kooistra, 2006).

Como se mencionó anteriormente el ciclo reproductivo canino puede dividirse en cuatro estadios (proestro, estro, diestro y anestro) los cuales describiremos a continuación.

Proestro

El proestro ha sido definido clínicamente como el estadio del ciclo estral en el que son fácilmente reconocidos en la hembra cambios externos (vulva edematosa y turgente, con descarga serosanguinolenta de origen uterino) que indican la proximidad del estro (Johnston y col., 2001). Este estadio habitualmente se extiende desde la primera observación de sangrado

hasta que la perra acepta al macho (Feldman y Nelson, 1987). En las perras maduras, la duración promedio es de 9 d con un rango de 0 a 27 d (Bell y Christie, 1971).

Signos clínicos

Durante el proestro, la perra usualmente atrae al macho pero no está receptiva, de manera que no permite el servicio. En el proestro temprano, la hembra desalienta activamente todo intento de cópula por parte del macho, puede reaccionar gruñendo, mostrando los dientes, tirando dentelladas y manteniendo la cola pegada contra el periné, entre los miembros posteriores cubriendo la vulva (Dumon y Fontbone, 1992). Este patrón de conducta cambia gradualmente a medida que avanza el proestro y la perra se torna más pasiva en su resistencia a la aproximación del macho. La hembra se vuelve más juguetona pero responderá gruñendo cuando el macho intente acercarse a sus cuartos traseros o se sentará para impedir el servicio. El macho será atraído por la presencia de feromonas en la descarga vulvar, la secreción de los sacos anales y la orina (Feldman y Nelson, 1987).

El proestro en general pero no siempre está asociado a cantidades variables de secreción vaginal sanguinolenta que proviene del útero y pasa a través del cuello uterino ligeramente relajado hacia la bóveda vaginal. Esta hemorragia es el resultado de la diapédesis y ruptura capilar subepitelial dentro del endometrio (Feldman y Nelson, 1996). El sangrado varía de perra a perra, siendo también variable la respuesta del animal ya que algunas perras se higienizarán más que otras, por lo cual será más difícil detectar el comienzo del proestro, a esto se añade en algunas razas como el collie la presencia de pelo largo y cola caída (Feldman y Nelson, 1987). En ocasiones una secreción mucoide parduzca puede observarse antes del sangrado verdadero y tumefacción vulvar, algunas hembras cesan el sangrado a medida que avanzan hacia el estro mientras que en otras la secreción se decolora y se torna transparente (Dumon y Fontbone, 1992).

A medida que avanza el proestro, la vulva se agranda y esto está asociado al edema y tumefacción de los labios vulvares. En el proestro tardío la vulva estará hinchada y turgente para luego ablandarse de manera notable en el estro al disminuir la misma (Feldman y Nelson, 1987; Concannon, 2003). Ya hacia el final del proestro pueden ser observados tres reflejos sexuales: 1) inclinación hacia arriba o guiño de la vulva en respuesta a la fricción de la piel inmediatamente dorsal a la vulva; 2) curvatura ipsilateral de los miembros posteriores en respuesta a golpes suaves en la piel a la derecha o izquierda de la vulva; y 3) desviación contralateral o vertical de la cola en respuesta a golpes suaves en la piel a cada lado de vulva. Estos reflejos sexuales están ausentes en el anestro, aparecen y se incrementan durante el proestro tardío y alcanzan su pico máximo de expresión durante el estro temprano y medio (Beach y col., 1982).

Hallazgos vaginoscópicos

La observación macroscópica de la mucosa de la vagina mediante vaginoscopía permite observar que en el proestro temprano, la mucosa se torna edematosa, gruesa, de color rosa pálido, con pliegues redondeados, de borde liso que llenan la luz vaginal. El fluido uterino, a veces abundante es claro y de color rojo brillante. A medida que avanza el proestro los pliegues se tornan más turgentes e hiperémicos, mientras que el fluido observado puede mantener la cuantía del proestro temprano y medio o disminuir (Feldman y Nelson, 1996).

Perfiles hormonales

Esta fase se encuentra bajo influencia de los Estrógenos (dominancia estrogénica). El proestro forma parte de la fase folicular y las fluctuaciones hormonales ocurridas en este estadio se relacionan con la concentración creciente de estrógenos relacionada con el desarrollo folicular. Los estrógenos son sintetizados y secretados por los folículos ováricos en desarrollo que crecen por influencia de las hormonas gonadotróficas hacia el final del anestro. En el anestro los folículos comienzan a crecer en forma continua, pero no logran madurar sin el apoyo hormonal de la pituitaria. Aquellos folículos que desarrollan en el momento que coincide con la estimulación gonadotrófica (aumento de LH) maduran y son capaces de sintetizar y secretar estrógenos. En el proestro temprano los folículos miden 2-3 mm y llegan al final de este estadio a 5-8 mm (Concannon, 2009). El E_2 es el responsable de los cambios de conducta, secreción vaginal, atracción del macho, preparación del útero para la gestación y otros cambios del proestro.

Las concentraciones circulantes de E_2 durante el anestro suelen ser de 5 a 15 pg/ml (Concannon, 2009; Feldman y Nelson, 1996; Johnston y col., 2001) Inmediatamente antes del proestro clínico se produce un incremento por encima de 15 pg/ml, durante este período ocurre un importante incremento en la producción de andrógenos, presumiblemente por las células de la teca y que sirve como precursor para el incremento del E_2 . El aumento de andrógenos se evidencia como elevaciones periféricas de testosterona y androstenediona que acompañan los aumentos del E_2 y que alcanzan picos de 800 y 300 pg/ml respectivamente (Concannon, 2011; Concannon y Castracane, 1985). Las concentraciones séricas de E_2 comienzan a elevarse 15 d antes del pico de LH y alcanzan sus valores máximos ($79,1 \pm 9,2$ pg/ml) 24-48 hs antes del pico de LH (Onclin y col., 2002). El proestro temprano cursa con concentraciones séricas de E_2 mayores a 25 pg/ml y en el proestro tardío alcanza picos que suelen superar los 60 a 70 pg/ml, con un rango de 40-120 pg/ml, para retornar en forma progresiva a los niveles basales durante los próximos 5 a 9 d. El pico de

concentración sérica de E_2 se produce 24 a 48 h antes de que ocurra la aceptación del macho y comience la declinación de las concentraciones de esta hormona.

Las concentraciones de P_4 se encuentran basales ($< 0,5$ ng/ml) durante todo el proestro salvo en las últimas 12 a 48 h. El final del proestro y el comienzo del estro están caracterizados por concentraciones séricas de P_4 que se elevan por encima de $0,5$ ng/ml, al mismo tiempo que la concentración sérica de E_2 disminuye. Este incremento de la P_4 sérica está relacionado con la luteinización preovulatoria de los folículos (Olson y col., 1982). Es importante remarcar que ya durante el proestro medio, los folículos de la perra doméstica muestran evidencia morfológica de luteinización (Zhou y col., 1996). Los niveles séricos de LH permanecen cerca de los valores basales durante la mayor parte del proestro, habiéndose comunicado valores superiores a estos en el anestro tardío y proestro temprano (Olson y col., 1982, Wildt y col., 1978).

Durante el proestro, los niveles de LH se vuelven progresivamente más bajos y sus pulsos menos detectables o no detectables debido al feedback negativo inducido por los E_2 (Concannon., 2009). Las concentraciones de LH al final del proestro (entre 28 h y 72 h antes del pico de LH) poseen un valor promedio de $1,9$ ug/L. Las concentraciones de gonadotrofinas elevadas en el proestro temprano retornan a niveles basales hasta la próxima onda en el comienzo del estro (Feldman y Nelson, 1987). Las concentraciones de FSH disminuyen durante el proestro, (Olson y col., 1982) probablemente en relación a la retroalimentación negativa sobre FSH ejercida por una hormona producida por el folículo ovárico en desarrollo denominada inhibina (Mondain-Monval y col., 1993). Entre 28 y 72 h antes del pico preovulatorio, la FSH alcanza valores promedio de $1,6$ UI/L. El proestro finaliza cuando comienza la conducta receptiva entre $0,5$ y 3 d después del pico de E_2 . Endocrinológicamente el proestro termina con la ocurrencia de la onda preovulatoria de LH (Concannon, 2011).

Olson y col (Olson y col., 1982), comunicaron elevadas concentraciones de prolactina cinco días previos a la onda preovulatoria de LH, (Jones y Boyns, 1976) comunicaron que el E_2 estimula la liberación de prolactina desde la pituitaria, por lo tanto altas concentraciones de PRL, podrían ser esperadas durante el proestro (Olson, 1982).

Citología vaginal

La apariencia de las células exfoliadas de la vagina refleja el aumento de las concentraciones séricas de E_2 . En las muestras de citología vaginal obtenidas durante el proestro temprano se observa una imagen similar a la del anestro tardío, pero con una gran diferencia, la presencia de sangrado vaginal, por lo tanto se observará un número variable de eritrocitos junto con escasas células parabasales, numerosas células intermedias y escasas células intermedias superficiales. Es corriente observar neutrófilos aunque en bajo número, pudiendo también estar presentes bacterias en pequeñas o grandes cantidades. El fondo de

estos extendidos a menudo tiene aspecto sucio debido a la presencia de secreciones cervicales y vaginales viscosas. En el proestro medio, el primer indicio de un efecto estrogénico continuo sobre la citología vaginal es la desaparición de los neutrófilos. Estas células entran a la luz vaginal a través del epitelio vaginal pero luego ya no pueden atravesar la pared vaginal de múltiples capas inducida por los E_2 , los neutrófilos no deberían ser observados nuevamente hasta el diestro. El número de células parabasales e intermedias pequeñas disminuye y son reemplazadas por células intermedias grandes e intermedias superficiales. Los eritrocitos pueden o no estar presentes y el fondo es sucio o claro. En el proestro tardío el frotis vaginal no contiene neutrófilos, la presencia de eritrocitos es variable y el fondo es claro. Más del 80% de las células vaginales son superficiales con núcleos picnóticos o anucleadas (Feldman y Nelson, 1987; Johnston, 2001). Foto 1.

Estro

El comienzo del comportamiento de estro se caracteriza por la receptividad de la hembra que permite el servicio y la aparición de reflejos posturales específicos. El primer día que la hembra permite la cópula es el comienzo del periodo de comportamiento de estro y esta fase finaliza cuando esta ya no acepta el servicio (Feldman y Nelson, 1996).

Signos clínicos

El comienzo de período receptivo a menudo coincide con la onda de LH, aunque puede ocurrir 1-4 d después o en algunas ocasiones nunca producirse a pesar de perfiles hormonales normales y ovulaciones fértiles demostradas por la ocurrencia de preñez luego de la inseminación artificial. La causa de esta desconexión entre la onda de LH y el comportamiento de aceptación del macho aún no se conoce pero indica que existen diferentes vías nerviosas con diferente sensibilidad a los cambios en la relación E_2 : P_4 (Concannon, 2009).

Los cambios de conducta relacionados con el estro son los de una creciente receptividad al macho. Las perras se agachan y elevan el perineo hacia el macho. La presión sobre o cerca de la grupa hará que la cola sea corrida hacia lateral y se hace evidente la tensión del tren posterior para sostener el peso de la monta (Feldman y Nelson, 1996). La perra en celo puede ser pasiva y aceptar al macho o puede abordarlo activamente. Se ha considerado que la perra solo aceptará un macho dominante y rechazará a los sumisos; de esta manera la hembra llevada al territorio del macho tiene más probabilidades de mostrar sumisión y recepción (Concannon, 2003). La vulva continúa aumentada de tamaño pero el edema disminuye siendo entonces más flácida que en el estadio anterior para favorecer la penetración del macho. La descarga vulvar disminuye en grado variable y contiene menos sangre que en el proestro, por

lo que se vuelve de coloración más clara, sin embargo algunas hembras pueden tener descarga sanguinolenta sin variaciones de color entre el estro y el proestro. En ocasiones, la secreción vaginal puede contener suficiente glucosa como para obtener un registro positivo en las tiras reactivas para orina. Esto puede estar causado por las crecientes progesteronemias que promueven intolerancia a los carbohidratos mediante la estimulación de la GH inducida por la progesterona (Feldman y Nelson, 1996).

Hallazgos vaginoscópicos

Luego del pico preovulatorio de LH, los pliegues de la mucosa desarrollan surcos en su superficie, con borde arrugado, el color es más pálido y su tonalidad es grisácea, disminuye el edema y ya no ocupan toda la luz vaginal (Feldman y Nelson, 1996; Johnston y col, 2001). Se puede observar que los pliegues pierden progresivamente el edema, ya no ocupan toda la luz, son más bajos y se hacen menos turgentes a medida que se acerca la ovulación (Concannon, 1989; Lindsay, 1983). Estos cambios observados en la mucosa vaginal ocurren como respuesta a la abrupta declinación en el rango E_2 : P_4 , la máxima crenulación suele observarse entre los días 4 y 5, si se considera día cero al día del pico pre ovulatorio de LH (Concannon, 2011).

La duración promedio del celo (comportamiento de estro) es de 9 d con un promedio de 4 a 24 d (Bell y Christie, 1971). Debido a las variaciones observadas en el comienzo del comportamiento de estro en relación a la ovulación es preferible tanto para fines clínicos como de investigación considerar un estro endocrinológico. Este comienza con el pico de LH y termina cuando la observación del extendido vaginal indica el primer día del diestro, momento en que la mayoría de los ovocitos oviductales han degenerado. La abrupta caída en el porcentaje de células superficiales que indica el comienzo del diestro, ocurre en promedio, 8 d después del pico de LH. Pudiendo ocurrir tan temprano como 6 y tan tarde como 11 d después del pico de LH. Tanto la fertilidad como el número de ovocitos fértiles declinan rápidamente entre los días 6 y 9 luego del pico de LH (Concannon, 2003).

Perfiles hormonales

La estrogenemia alcanza su pico, 1 o 2 d antes del comienzo del estro. El estro está asociado con una continua declinación de las concentraciones séricas de E_2 . La perra comienza a ser receptiva cuando la concentración sérica de E_2 cae a niveles basales y la concentración sérica de P_4 supera los niveles basales es decir alcanza niveles superiores o iguales a 2 ng/ml alcanzando luego valores de 4-10 ng/ml lo cual marca el comienzo de la fase lútea (Concannon, 1989, Johnston y col., 2001). Es probable que la disminución en la relación

E₂: P₄ tenga también un efecto en la secreción de feromonas responsables de la atracción del macho (Concannon, 2009). De esta manera las concentraciones de P₄ el día del pico de LH estarán entre 0,8 y 3,0 ng/ml, dos días después cuando ocurre la ovulación los valores se encontrarán entre 1,0 y 8,0 ng/ml (Concannon, 2003). La disminución de las concentraciones séricas de E₂ es un reflejo del proceso madurativo final de los folículos varios días antes de la ovulación (Feldman y Nelson, 1987). La declinación de las concentraciones séricas de E₂, precede e influye sobre el pico de LH que ocurre el día 0 del ciclo y antecede a la ovulación (Concannon y col., 1979). Existe evidencia de que el pico de LH es iniciada por la declinación en las concentraciones séricas de E₂ y es facilitada por el incremento simultáneo en las concentraciones de P₄ (Concannon, 1993; Concannon, 2003).

Es así que la combinación de concentraciones séricas crecientes de P₄ y decrecientes de E₂ estimula dos eventos mayores. El primero es el cambio en la conducta de la hembra que se vuelve receptiva y el segundo es la retroalimentación positiva que estimula un pico de FSH y LH cuando comienza la aceptación del macho.

Las concentraciones séricas de androstenediona se encuentran elevadas y con variaciones (73 ± 13 ng/dl) cerca del pico de LH, declina durante el estro y aumenta nuevamente alcanzando valores de entre 40 y 127 ng/dl entre los días 6 y 18 tanto en perras preñadas como vacías para declinar nuevamente alrededor del día 20 (Concannon y Castrance, 1985). Si bien se observaron elevaciones de testosterona y androstenediona durante la fase folicular, en la fase lútea sólo se observó incremento de androstenediona (Concannon y Castrance, 1985). Además se observó un pico preovulatorio de PRL, que fue también reportada en otras especies como ratas, ovejas (de Gier y col., 2006).

La P₄ aumenta poco a poco durante el proestro, desde sus valores basales de 0,2-0,4 ng/ml a valores pre-ovulatorios de 0,6-1,0 ng/ml, lo que refleja la luteinización parcial de los folículos visible histológicamente 6 d antes del pico de LH (Concannon, 1993). Luego la P₄ sufre un incremento rápido y manifiesto (≥ 0,9 y en general de 1,0-2,0 ng/ml) concomitante con el pico de LH y la intensa luteinización pre-ovulatoria de los folículos. Es decir que las células luteinizadas capaces de sintetizar y secretar P₄, son funcionales antes que aparezca el CL. Estas células son las responsables de la elevación pronunciada inicial de la P₄ sérica asociada con el inicio de la aceptación del macho. La declinación del nivel de E₂ junto con el aumento de la P₄ sérica puede ser necesaria para la conducta estral de receptividad máxima (Feldman y Nelson, 1996). Se considera también que esta combinación hormonal inicia el pico de LH en la perra (Concannon y col, 1979). Las concentraciones séricas de LH desde el comienzo del pico pre-ovulatorio hasta la concentración máxima fluctúan entre 4,0-40,0 ng/ml, dicho pico ocurre 1-3 d después del pico de estradiol (Concannon y col, 1975). El pico de LH posee una fase de elevación de 12 a 24 h de duración y una de descenso de 12 a 36 h con un promedio de duración de aproximadamente 1,5 d (Concannon, 2009). El pico preovulatorio de LH es relativamente más largo, en comparación con lo que ocurre en otras especies como los bovinos en los que posee una duración de 8 h (de Gier y col., 2006). Durante el pico pre ovulatorio de

LH aumentan simultáneamente FSH y LH. La elevación de FSH resulta en un pico 0,5-1 d después del pico de LH y la fase de declinación hasta los niveles basales es 1-2 d más larga que para LH. Por lo que la duración del pico de FSH es mayor que el de LH. Mientras que para FSH el pico de elevación es dos veces la media de los valores del anestro, para LH es de 10-100 veces la media de los valores del anestro (Concannon, 2009). El pico de LH es seguido por el inicio de la ovulación 24 a 48 h más tarde, para luego producirse la formación del CL. La concentración de P_4 sérica aumenta constantemente en estos días y continúa incrementándose por 1 a 3 semanas. Es así que el estro es un período en el que ocurre progresiva caída de E_2 , progresivo aumento de la P_4 y un pico breve (12 a 24 h de duración) de liberación de LH (Jeffcoate, 1998).

Algunos cambios hormonales y de comportamiento, relacionados con el comienzo del estro pueden ser variables. Mientras que algunos investigadores han reportado que el pico de LH ocurre el primer día que aparecen los signos de estro otros no hallaron esta correlación (Olson y col., 1982; Wildt y col., 1978). En algunas hembras el comienzo del comportamiento de estro puede ocurrir tan temprano como 2-3 d antes del pico de LH, mientras que en otras no comienza hasta 4 o 5 d después del pico de LH. La duración del pico preovulatorio de LH puede variar, con rangos de 24 a 96 h (Johnston y col., 2001; Olson y col., 1982; Wildt y col., 1978). Luego del pico de LH, las concentraciones de esta hormona permanecen bajas con valores semejantes a los del anestro, proestro temprano o diestro debido a la depleción de la LH pituitaria (Olson y col., 1982). La ovulación ocurre aproximadamente 2 o 3 d después de que ocurre la onda preovulatoria de LH. La perra ovula ovocitos primarios, por lo tanto, no podrán ser fertilizados hasta 48 o 72 h luego de ocurrida la ovulación, cuando se produce la primer división meiótica y se transforman en secundarios. En este momento los ovocitos han descendido dos tercios a través de los oviductos y se encuentran listos para ser fecundados (Phemister y col., 1973). Estos ovocitos secundarios serán viables durante 24-48 h en la mayoría de las perras, durante 72-96 h en algunas hembras y pueden llegar en unas pocas a ser viables durante 120 a 144h (Concannon, 2011).

El incremento gradual de las concentraciones séricas de P_4 resultantes de la luteinización preovulatoria de los folículos continúa hasta después del pico de LH, cuando sufre el incremento más importante. Los cánidos parecen ser los únicos en mostrar comportamiento de estro en la fase de altas concentraciones de progesterona. Esta variación en las concentraciones de P_4 durante el estro puede ser utilizado, junto con otros parámetros como citología vaginal, vaginoscopía y determinación de LH para estimar el momento de ovulación (Johnston y col., 2001; Jeffcoate, 1998). Se ha demostrado que la perra normal tiene un aumento de los niveles séricos de testosterona durante el proestro. La testosterona alcanza la máxima concentración cerca de la onda preovulatoria de LH y la conducta de receptividad. Luego de esto los niveles declinan (Olson, 1984a).

Citología vaginal

Durante el celo, la citología vaginal se mantiene constante, no existen modificaciones que sugieran el pico de LH o de ovulación o el momento de la fertilización. Las células superficiales nucleadas y anucleadas representan más del 80% del las células vaginales totales y a menudo alcanzan el 100%. No se observan neutrófilos, los eritrocitos pueden o no estar presentes y el fondo del extendido está limpio. Si bien el porcentaje de células superficiales puede fluctuar, nunca será menor al 60% y por lo general se mantiene entre el 80% y el 100%. La citología vaginal es un parámetro que por sí sólo es de poca utilidad para predecir el primer día de estro (Olson, 1982b). Fotos 2 y 3.

Diestro

Signos clínicos

El diestro comienza con el cese del celo, la perra rechaza al macho, al tiempo que es menos atractiva. La descarga vaginal disminuye hasta desaparecer al igual que el edema vulvar.

Hallazgos vaginoscópicos

En la vaginoscopia se observa que los pliegues de mucosa se tornan delgados, lisos y flácidos. El mucus es de color amarronado y filamentososo (Concannon, 1989; Feldman y Nelson, 1996; Lindsay, 1983).

El primer día del diestro es fácilmente identificado por la mayoría de los veterinarios realizando citología vaginal. En este momento la perra ya no está en su periodo fértil por lo que este método puede utilizarse retrospectivamente, para saber si el servicio fue realizado en el momento adecuado, pero no para determinar el momento óptimo de servicio.

Perfiles hormonales

Las células del CL canino, aparentemente están pre-programadas para crecer diferenciarse y sobrevivir durante el período de tiempo de una gestación normal, con un promedio de 65 días. Las células lúteas desarrollan rápidamente a partir de sus progenitoras en la teca y/o granulosa por mitosis e hipertrofia, junto con el crecimiento de capilares y estroma que llenará todo o casi todo el antro lúteo por 10-15 d en la mayoría de los casos. Durante la luteinización

de los folículos, se puede observar en cortes histológicos, que la misma involucra la pérdida de la integridad morfológica de las células de la granulosa y el crecimiento y conservación de la morfología de las células de la teca interna, esto sugiere que es esta última la que contribuye en mayor parte a la formación del CL en los caninos. Tanto la LH como la PRL actúan como hormonas luteotróficas a partir del día 14 o antes. El útero no gestante carece de efecto sobre la función lútea y la histerectomía no alarga la fase lútea. Por otra parte a diferencia de lo que ocurre en otras especies, no existe un mecanismo uterino luteolítico que acorte el ciclo en ausencia de gestación. Sin embargo la PGF es luteolítica después del día 20 y puede suprimir la producción de P_4 y por lo tanto inducir el aborto (Concannon, 2009).

La duración de la fase lútea en las perras no preñadas es mayor que en las preñadas, y juega un rol importante en la duración del intervalo interestrual en las perras, en las que los niveles de P_4 por encima de 2 ng/ml previenen el incremento pre-proestro en los pulsos de GnRH. La duración del anestro puede en parte ser dependiente de la duración de la fase lútea (Concannon, 2009).

Se ha comunicado cierta influencia racial en la duración de las fases del ciclo en los perros. Los perros de raza Ovejero Alemán presentan intervalos interestrales más cortos, fases lúteas y períodos de anestro más cortos que en otras razas (Gunzel-Apel y col., 2006).

Las concentraciones de P_4 sérica aumentarán rápidamente por encima de 1 o 2 ng/ml 72 a 96 h antes de la ovulación y continuarán aumentando durante el estro alcanzando picos de 15 a 90 ng/ml durante 15 a 30 d después del pico de LH (Concannon, 1989). Luego las concentraciones de P_4 comenzarán a declinar gradualmente durante las próximas 5 o 6 semanas (Figura 1.3). Las perras normales no gestantes que han pasado el celo poseen CL funcionales a pesar de la ausencia de gestación, el CL de las perras no gestantes posee un período funcional mayor que el de las gestantes (Olson, 1984b). Siempre ocurrirá una importante estimulación del tejido mamario a causa de la P_4 y este desarrollo mamario puede persistir 1 o dos meses después de que los niveles de P_4 retornaron a sus valores basales (Concannon, 2003). Una vez transcurrido el período de meseta de la concentración de P_4 sérica del diestro, sigue una declinación prolongada de la función lútea. La fase lútea finaliza abruptamente en la perra gestante con el parto (aproximadamente 65 d pos fertilización). Mientras que en la no gestante la fase lútea cae lentamente durante un lapso adicional de 10 a 20 d (Feldman y Nelson, 1987; Feldman y Nelson, 1996). Es decir que la duración del diestro será de 2 a 3 meses en ausencia de preñez (Feldman y Nelson, 1987; Feldman y Nelson, 1996). Las concentraciones de P_4 sérica son semejantes en hembras preñadas y en hembras no preñadas en diestro. Se observó que las concentraciones de P_4 sérica serán levemente mayores en perras preñadas, pero las diferencias individuales hacen que la medición sérica de esta hormona no sea de utilidad en el diagnóstico de preñez (Concannon y col., 1975).

En esta especie el mantenimiento de la preñez depende de la producción ovárica de P_4 (Sokolowski, 1971). El CL parece ser la única fuente de P_4 durante la preñez y la inducción de luteólisis en cualquier momento de la gestación causa interrupción de la preñez o parto

premature (Wildt y col., 1978). La caída abrupta de la P_4 a valores por debajo de 1 a 2 ng/ml ocurre antes del alumbramiento y es necesaria para que ocurra un parto normal. Puede observarse desarrollo mamario durante el diestro, tanto en hembras preñadas como no preñadas debido al aumento de la P_4 circulante (Johnston y col., 2001). Se requiere la secreción normal de PRL para que se produzca el pico de secreción de P_4 entre los días 8 y 30 de gestación y parece ser un requerimiento absoluto para la secreción de P_4 después del día 30 (Concannon, 2003). Los trabajos realizados indican que el CL requiere soporte de luteotropinas durante el diestro, siendo este imprescindible a partir del día 21 (England, 2004). En perras, la LH y la PRL son luteotróficas aproximadamente a partir de la segunda semana después de la ovulación y durante toda la fase lútea tanto en hembras preñadas como en no preñadas. Si bien algunos autores han sugerido que la LH juega un rol secundario al de la prolactina (Vestergren y Onclin, 2008). Existe evidencia que sugiere que por el contrario la LH juega un rol central y activo en la función lútea (Concannon, 2009). La disminución en la P_4 circulante como consecuencia de una inmunoneutralización de LH o la disminución de la PRL por agonistas dopaminérgicos como bromocriptina, lleva a algunos investigadores a concluir que en perros, la función lútea durante la última mitad del diestro requiere tanto de LH como de PRL (Concannon, 1987). Por otra parte, otros investigadores sostienen que la PRL pero no la LH es necesaria durante la segunda mitad del periodo lúteo (Okkens y col., 1990). En la perra, la función luteal durante la primera mitad del diestro puede ser menos dependiente de la pituitaria (Johnston y col., 2001). La razón de esta diferencia es aún desconocida, pero se sabe que no es debida a las fluctuaciones en los receptores para LH y PRL en el tejido lúteo (Fernandes y col., 1987). La concentración de PRL se incrementa en las perras no preñadas concomitantemente con la disminución de la P_4 (Concannon, 1993), un fenómeno a menudo asociado con la ocurrencia de pseudopreñez (Gerres y Hoffman, 1994). Se observó también que la concentración de receptores de PRL en el cuerpo lúteo se mantiene constante durante el diestro (Concannon, 2009; Fernandes y col., 1987). Se podría concluir entonces que la regresión del cuerpo lúteo ocurre independientemente de la disponibilidad de PRL.

Citología vaginal

La citología vaginal de una perra que entra en el diestro está claramente demarcada de la que se observa en una perra al final del estro, ya que el porcentaje de células superficiales cae hasta casi el 20% y el resto de las células son por lo general intermedias. Esto marca un cambio abrupto y evidente en la citología. Pueden reaparecer los leucocitos en el frotis, pero esto no siempre ocurre. Algunas veces pueden observarse células metaestrais, que son células epiteliales vaginales con uno o dos neutrófilos en su interior, pero también pueden ser observadas en otros momentos del ciclo en los que se encuentren neutrófilos y células espumosas que son células epiteliales vaginales con citoplasma espumoso. Luego de los

primeros días del diestro, la citología vaginal es similar a la del anestro con leucocitos y eritrocitos en cantidades escasas y las células epiteliales corresponden a intermedias y parabasales (Beach y col., 1982; Feldman y Nelson, 1996). Fotos 4 y 5.

Anestro

La transición de la fase lútea al anestro es gradual y en general se considera el final de la primera cuando las concentraciones de progesterona se encuentran por debajo de 1 ng/ml. La duración del anestro varía entre las perras, por variaciones de origen genético y en la duración del intervalo interestral debidas por ejemplo a diversas condiciones medioambientales y de salud (Concannon, 2003; Okkens y Kooistra, 2006)

Signos clínicos

Es la fase de reposo del ciclo reproductivo canino que puede ser definida sobre la base de los signos clínicos y de comportamiento. La perra en anestro, no atrae al macho y no está receptiva para el servicio. La vulva es pequeña y la descarga vaginal escasa o ausente. En la hembra no preñada, no existe una demarcación clínica obvia entre el diestro y el anestro.

Hallazgos vaginoscópicos

En el estudio vaginoscópico de la mucosa se pueden observar pliegues delgados, flácidos y pálidos. La mucosa es delgada frágil y de apariencia rosada debido a que se pueden observar los vasos sanguíneos que se encuentran por debajo (Concannon, 2003). La duración del anestro es variable y depende de la edad, salud, raza y otros factores. En la perra promedio durará aproximadamente 16 a 18 semanas Si bien pueden ocurrir extremos de 8 a 40 semanas (de Gier y col., 2006).

Perfiles hormonales

Endocrinológicamente, el anestro suele ser definido como el periodo que sigue al diestro, cuando las concentraciones de progesterona sérica alcanzan niveles basales por debajo de 0,5 a 1,0 ng/ml.

La progresión desde el anestro temprano al tardío en la perra, se caracteriza por el incremento en la liberación de GnRH desde el hipotálamo. Así, en el anestro tardío, se produce

el aumento en la liberación pulsátil desde el hipotálamo de GnRH que induce la liberación de gonadotropinas pituitarias, FSH y LH cuya pulsatilidad aumentan con la proximidad del proestro (Concannon y col., 1986; Olson 1984a; Feldman y Nelson 1996; Shille y col., 1987). A medida que avanza el anestro, se produce un aumento de la sensibilidad de la pituitaria a GnRH y de la respuesta del ovario a las gonadotrofinas (Okkens y Kooistra, 2006). Luego de la estimulación pituitaria, el patrón de liberación será rápido y transitorio para LH y lento y sostenido para FSH (Feldman y Nelson, 1996). Las concentraciones séricas de FSH aumentan, alcanzando en el anestro tardío niveles semejantes a los observados durante la onda preovulatoria de FSH durante el estro. Concannon (1993, 2009) y Hoffman y col. (1996), mencionan que el incremento de LH al final del anestro es el principal factor involucrado en la reanudación de una completa función ovárica y la FSH que se encuentra presente durante la mayor parte del anestro podría no ser biológicamente activa.

Durante la mayor parte del anestro, la LH permanece en valores basales, ≤ 1 ng/ml, y a medida que se acerca el anestro tardío los pulsos son de 2-25 ng/ml cada 6 a 24 h y en los últimos 14 d si bien mantienen la amplitud, disminuyen los intervalos que ahora son de 60-90 minutos, para finalmente elevarse por encima de 3 ng/ml. Sesenta días antes del proestro ocurre un aumento mucho menos pronunciado de FSH (Concannon, 2009).

Por otra parte Okkens (2006) y Onclin (2002), observaron que el incremento de FSH circulante es el evento clave en la foliculogénesis y por lo tanto en la terminación del anestro (Okkens y Kooistra, 2006). Las concentraciones de LH y FSH aumentan dramáticamente en hembras ovariectomizadas cuando se las compara con las perras en anestro (Olson y col., 1992). Las concentraciones de E_2 , durante el anestro permanecen bajas observándose un pico de secreción aproximadamente un mes antes del pico pre ovulatorio de LH aumentando luego, en el proestro con el desarrollo folicular (Jeffcoate 1992; Jeffcoate, 1993; Olson y col., 1982).

La PRL podría influenciar el fin del anestro y el inicio del proestro, sus niveles séricos han sido comunicados como variables a lo largo del proestro (Olson, 1982). Existen diversos trabajos que han logrado buenos resultados al utilizar agonistas dopaminérgicos en la inducción de celo. Sin embargo trabajos más recientes indicarían que solo el descenso de la prolactina no sería suficiente para lograr el fin del anestro, por lo cual bromocriptina y cabergolina lograrían el inicio del proestro por otros mecanismos. (Kooistra y col., 2001; Spattani y col., 2007; Vetergen y col., 1999).

Citología vaginal

En los extendidos vaginales predominan las células parabasales y las intermedias pequeñas. Los neutrófilos pueden o no estar presentes y los eritrocitos suelen no observarse.

Pueden o no encontrarse bacterias y la apariencia del fondo del extendido puede ser clara o sucia (Feldman y Nelson, 1996). Foto 6.

Bibliografía

- Bell, E.; Christie, DW. (1971). "Duration of proestrus, oestrus and vulvar bleeding in the beagle bitch". *Br J Vet.*, 127, pp. 25-28.
- Concannon, P W. (1989). "Induction of fertile oestrus in anoestrous dogs by constant infusion of GnRH agonist." *J Rep Fert.*, 39, pp. 149-160.
- Concannon, P W. (1993). "Biology of gonadotropin secretion in adult and prepubertal female dogs". *J Reprod Fertil.*, 47, pp. 3-27.
- Concannon, P W. (2003) "Reproductive biology and breeding management of the female dog." *Rev Bras Reprod Anim.*, 27, pp. 157-165.
- Concannon, P W. (2009). "Endocrinologic Control of Normal Canine Ovarian Function." *Reprod Dom Anim.*, 44, pp. 3-15.
- Concannon, P W. (2011). "Reproductive cycles of the domestic bitch." *Animal Reproduction Science*, 124, pp. 200-210.
- Concannon, P W.; Castracane, V D. (1985). "Serum androstenedione and testosterone concentrations during pregnancy and non pregnant cycles in Dogs". *Biology of Reproduction*, 33, pp. 1078-1083.
- Concannon, P W.; Cowan, R.; Hansl, W. (1979). "LH release in ovariectomized dogs in response to estrogen withdrawal and its facilitation by progesterone." *Biol Reprod*, 20, pp. 523-531.
- Concannon, P W.; Hansel, W.; Visek, W J. (1975). "The ovarian cycle of the bitch: plasma estrogen, LH, progesterone." *Biol Reprod.*, 13, pp. 112-121.
- Concannon, P W.; Weinstein, P.; Whaley, H. (1978). "Suppression of luteal function in dogs by luteinizing hormone antiserum and by bromocriptine." *J Reprod Ferti.*, 81, pp. 175-180.
- Concannon, P W.; Whaley, S.; Anderso, S P. (1986). "Increased LH pulse frequency associated with termination of anestrus during the ovarian cycle of the dog." *Biol. Reprod.*, 34, pp. 119.
- Concannon, P W.; McCann, J P, Temple, M. (1989). "Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog." *Reprod Fertil.* 39, pp. 3-25.
- de Gier, J.; Kooistra, H S.; Djajadiningrat-Laanen, S C.; Dieleman, S J.; Okkens, A C. (2006). "Temporal relations between plasma concentrations of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, estradiol-17b, progesterone, prolactin, and α -melanocyte-stimulating hormone during the follicular, ovulatory, and early luteal phase in the bitch." *Theriogenology*. 65, pp. 1346-1359.
- Dumon, C.; Fontbone, A. (1992). "Reproduction du chien et du chat. 82, avenue de Villiers 75017 Paris: Ed PMCAC.
- England, G C W. (2004). "Small animal reproduction". "En" Stornelli M A. *Work Shop*. (pp. 1-20). La Plata: Facultad de Ciencias Veterinarias. UNLP.

- England, G C W.; Allen, W E. (1991). "Repeatability of events during spontaneous and gonadotrophin-induced oestrus in bitches." *J Reprod Fertil*, 93, pp. 443-8.
- Feldman, E C.; Nelson, R W. (1987). "Canine female reproduction". "En" Feldman EC, Nelson RW (eds). Canine and feline endocrinology and reproduction. (p399-480) Philadelphia: WB Saunders.
- Feldman, E.; Nelson, R. (1996). Feline reproduction. In Feldman EC, Nelson RW (eds). "Canine and feline endocrinology and reproduction". (p 741-768) 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders.
- Fernandes, P A.; Bowen, R A.; Kostas, A C. (1987). "Luteal function in the bitch: changes during diestrus in pituitary concentration of and the number of luteal receptors for luteinizing hormone and prolactin". *Biol Reprod.*, 37, pp. 804-811.
- Fosberg, L C.; Wallen, A. (1992). "Effects of whelping and season of the year on the interoestrus intervals in dog". *J Small Anim Prac*, 33, pp. 67-70.
- Gerres, S.; Hoffmann, B. (1994). "Investigation on the role of progesterone in the endocrine control of overt pseudopregnancy in the bitch: application of an antigestagen and effects on corpus luteum function". *Animal Reproduction Science*, 35, pp. 281-189.
- Gunzel-Apel, A R.; Zabel, S.; Bunck, C F.; Dieleman, S J.; Einspanier, A.; Hoppen, H O. (2006). "Concentrations of progesterone, prolactin and relaxin in the luteal phase and pregnancy in normal and short-cycling German Shepherd dogs". *Theriogenology*, 66, pp. 1431-1435.
- Hoffmann, B.; Riesenbeck, A.; Klein, R. (1996). "Reproductive endocrinology of bitches *Animal Reproduction Science*". 42 (19), pp. 275-288.
- Jeffcoate, I A. (1993). "Endocrinology of anestrus bitches". *J Reprod Fertil.*, 47, pp. 69-76.
- Jochle, W.; Andersen, A C. (1977). "The estrous cycle in the dog: a review". *Theriogenology*, 7, pp.113-140.
- Johnston, S D.; Kuztritz, M V R.; Olson, P. (2001). "The Canine Estrous Cycle". "In": Ed. Johnston, S D.; Kuztritz, M V R.; Olson, P. Canine and feline Theriogenology, (pp. 262-264). Philadelphia: WB Saunders.
- Johnston, S D.; Romagnoli, S E. (1991). "Canine reproduction". *Vet Clin North Small Anim Pract.*, 21.
- Jones, G E.; Brownstone, A D.; Boyns, A R. (1976). "Isolation of canine prolactin by polyacrylamide gel electrophoresis". *Acta Endocrinol.*, 82, pp. 691-705.
- Kooistra, H.S.; Okkens, A.C. (2001). "Secretion of prolactin and growth hormone in relation to ovarian activity in the dog". *Reprod. Dom. Anim.*, 36, pp. 115-19.
- Lindsay, F E F. (1983). "The normal endoscopic appearance of the caudal reproductive tract of the cyclic and non-cyclic bitch: post uterine endoscopy". *J Small Anim Pract.*, 24, pp. 1-15.
- Mondain-Monval, M.; Fastard, W.; Smith, A J. (1993). "Relationships between gonadotropins, inhibin and sex steroid secretion during the periovulatory period and the luteal phase in the blue fox (*Alopex lagopus*)". *J Reprod Fertil.*, 47, pp.47-56.
- Noakes, D E.; Parkinson, T J; England, G C W. (2001). *Arthurs' Veterinary Reproduction and Obstetrics*. London: Ed. W. B. Saunders. Okkens A C, Bevers, M M.; Dieleman, S J. (1990).

- "Evidence for prolactin as the main luteotrophic factor in the cyclic dog". *Vet. Q.*, 12 (4), pp. 193-201.
- Okkens, A C and Kooistra, H S. (2006). "Anoestrus in the Dog: a Fascinating Story". *Reprod Dom Anim.*, 41, pp. 291–296.
- Olson, P N. (1984a). "Concentrations of testosterone in canine serum during late anestrus, proestrus, estrus, and early diestrus". *Am J Vet Res.*, 45, 145.
- Olson, P N. (1984b). "Vaginal cytology. Part 1. A useful tool for staging the canine estrous cycle". *Comp Cont Ed Pract Vet.*, 6, 288.
- Olson, P N.; Bowen, R A.; Behrendt, M D. (1982). "Concentrations of reproductive hormones in canine serum throughout late anestrus, proestrus and estrus". *Biol Reprod.*, 27, pp.1196-1206.
- Olson, P N.; Mulnix, J A.; Nett, T M. (1992). "Concentrations of luteinizing hormone and FSH in the serum of sexually intact and neutered dog". *Am J Vet Res.*, 53, pp.762-766.
- Onclin, K.; Murphy, B.; Vestergren, J P. (2002). "Comparison of estradiol, LH and FSH patterns in pregnant and nonpregnant beagle bitches". *Theriogenology*, 57, pp. 1957-1972.
- Phemister, R D.; Holst, P A.; Spanos, J S. (1973). "Time of ovulation in the beagle bitch". *Biol Reprod.*, 8, pp.74-82.
- Shille, V M.; Thatcher, M J.; Loyd, M L. (1987). "Concentrations of LH and FSH during selected periods of anestrus in the bitch". *Biol Reprod.*, 36, pp. 184.
- Sokolowski, J H. (1971). "The effects of ovariectomy on pregnancy maintenance in the bitch". *Lab Anim Sci.*, 21, pp., 696-699.
- Sokolowski, J H. (1977). "Reproductive patterns in the bitch". *Vet Clin North Anim.*, 7, pp. 653-666.
- Spatini, G.; Borghi, v.; Thuroczy, J.; Balogh, L.; Scaramuzzi, R J.; De Rensis, F. (2007). "Follicular development and plasma concentrations of LH and prolactin in anestrus female dogs treated with the dopamine agonist cabergoline". *Theriogenology.*, 68, pp. 826–833.
- Verstegen, J.; Onclin, K.; Silva, L.; Concannon, P. (1999). "Effect of stage of anestrus on the induction of estrus by the dopamine agonist cabergoline in dogs". *Theriogenology*, 51, pp. 597–611.
- Verstegen-Onclin, k.; Verstegen, J. (2008). "Endocrinology of pregnancy in the dog: A review". *Theriogenology.*, 70, pp. 291–299.
- Wildt, D T.; Chacrabarty, P K.; Panko, W B. (1978). "Relationship of reproductive behavioral, serum luteinizing hormone and time of ovulation in the bitch". *Biol Reprod.*, 18, pp. 561-570.
- Wildt, D E.; Seager, S W J.; Chakrabarty, P K. (1981). "Behavioral ovarian and endocrine relationships in the pubertal bitch". *J Anim Sci.*, 53, pp. 182-191.
- Zhou, J.; Adesanya, O.; Vatzias, G.; Hammond, J M.; Bondy, C. (1996). "Selective expression of insulin-like growth factor system components during porcine ovary follicular election". *Endocrinology*, 137, pp. 4893–4901.

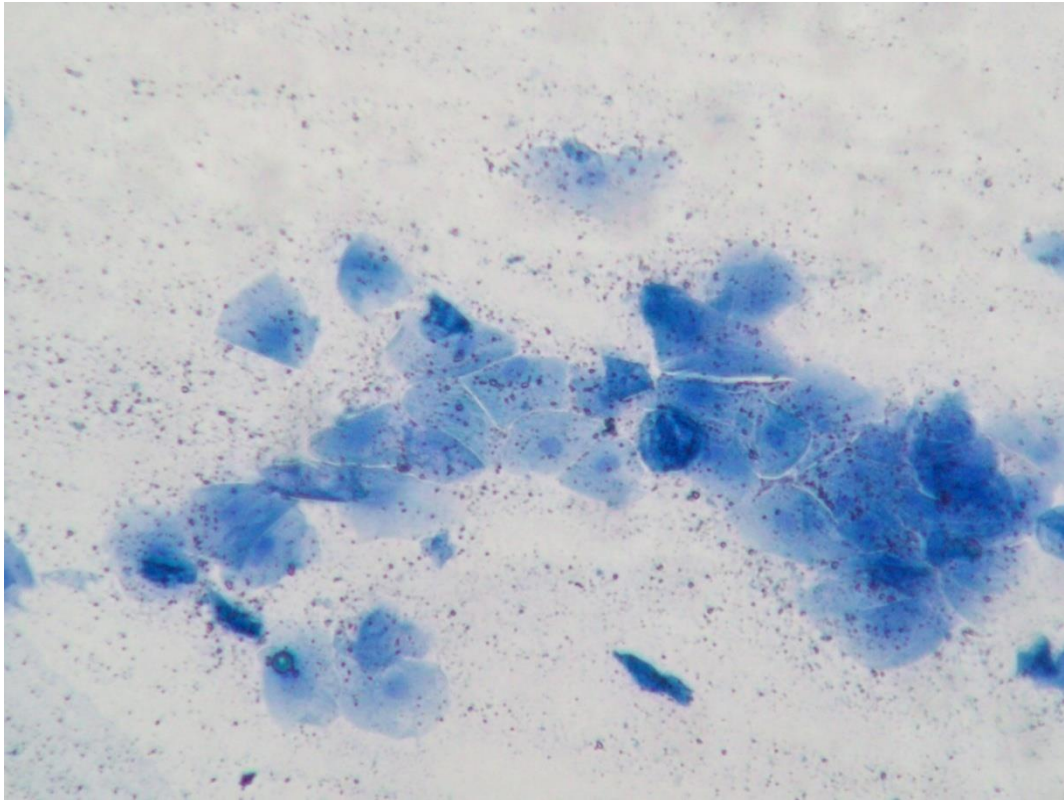


Foto 1: Citología vaginal de proestro. Objetivo 40X

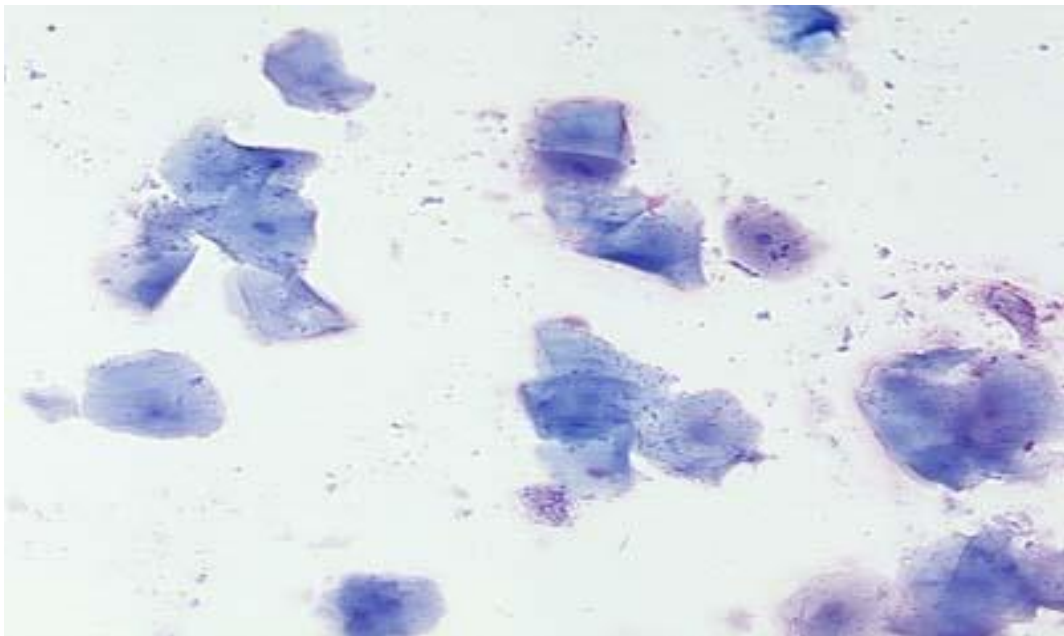


Foto 2: Citología vaginal de estro. Objetivo 40X.

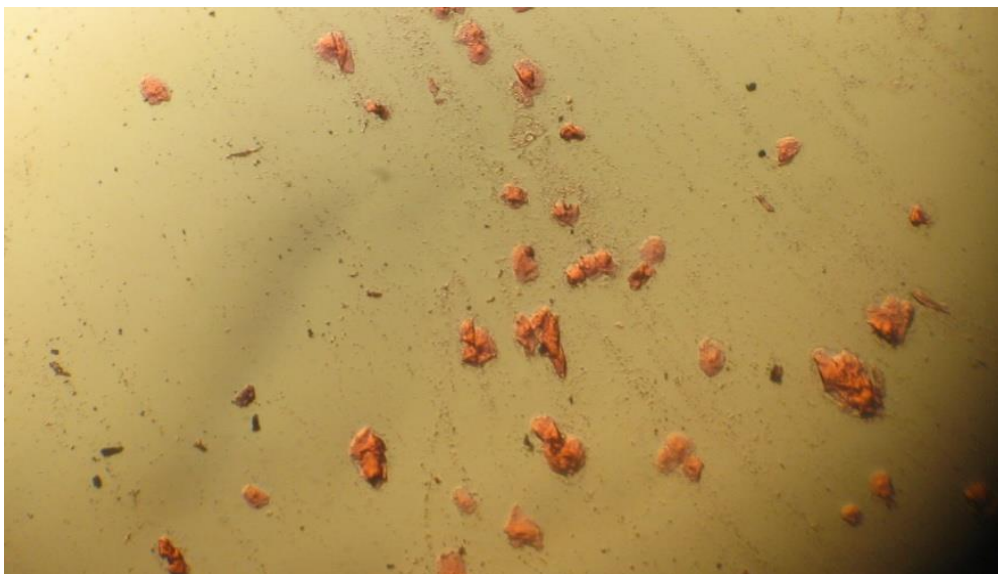


Foto 3: citología vaginal de estro. Objetivo 10X.

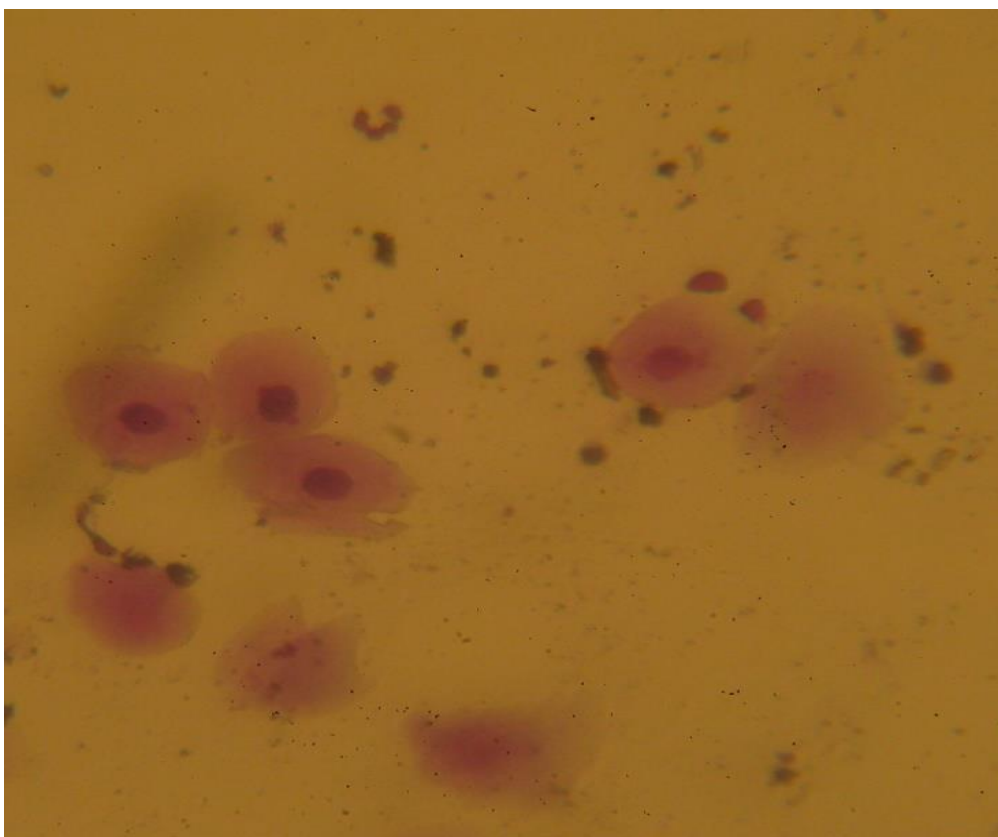


Foto 4: Citología vaginal de diestro. Objetivo 40X.

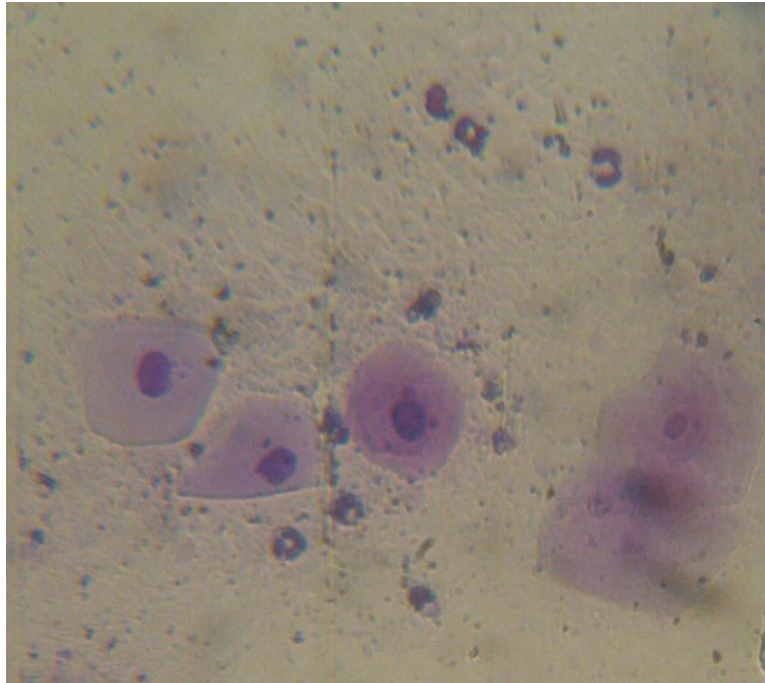


Foto 5: citología Vaginal de diestro. Objetivo 40X.

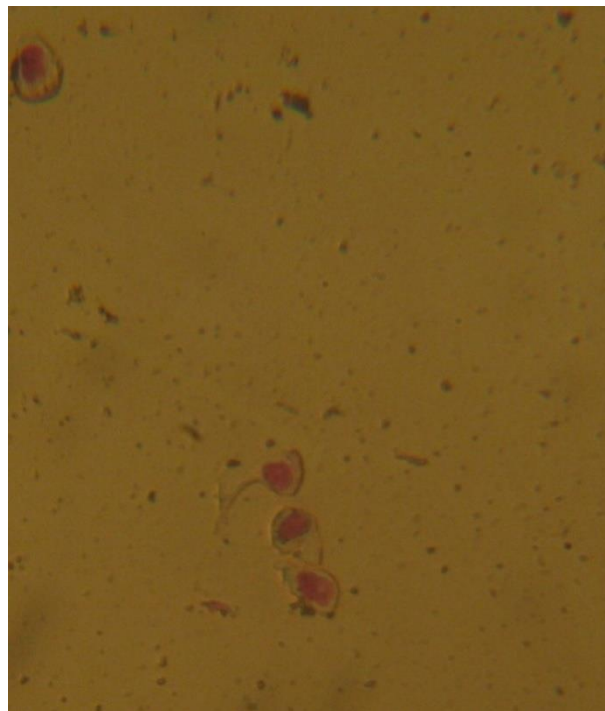


Foto 6: Citología Vaginal de anestro. Objetivo 40X.

CAPÍTULO 4

Ciclo estral felino

María Carla García Mitacek

Particularidades fisiológicas del ciclo estral felino

La gata doméstica es poliéstrica estacional fotoperíodo positiva. Es decir que ciclará de manera repetida durante una estación reproductiva a menos que el ciclo sea interrumpido por preñez, pseudopreñez o enfermedad (Feldman y Nelson, 2000). La estacionalidad reproductiva de la gata doméstica está íntimamente relacionada con el fotoperíodo y la concentración de melatonina sérica. Esta última, es una hormona derivada de la serotonina y es sintetizada y secretada principalmente por la glándula pineal. La liberación de melatonina sigue un ritmo circadiano, es liberada en períodos de oscuridad, momento en que se sintetiza (Scheer y Czeisler, 2005). Por el contrario, durante períodos de luz, la síntesis y secreción de melatonina esta inhibida (Scheer y Czeisler, 2005). Por lo tanto, al aumentar las horas luz, la duración de la secreción de melatonina disminuye y por consiguiente la concentración sérica de esta hormona es baja. Como consecuencia de las bajas concentraciones de melatonina sérica se producen pulsos de GnRH. La liberación pulsátil de GnRH provoca una liberación pulsátil de la gonadotropinas hipofisiarias especialmente de la hormona luteinizante. El mencionado mecanismo fisiológico desencadena la ocurrencia de ciclos cuando las gatas tienen una disposición lumínica de 12 h luz diarias o más es decir en el período reproductivo. Por el

contrario, al disminuir las horas luz, la duración de la secreción de melatonina aumenta y por lo tanto la concentración de melatonina sérica es alta. Como consecuencia del cambio en la duración de la liberación de melatonina no ocurren pulsos de GnRH y el eje gonadal hipofisiario está quiescente. De esta manera la melatonina regula el estado funcional de las gónadas y controla la capacidad reproductiva de un animal según la estación del año (Vieytez, 1995).

En resumen, en nuestro país las gatas presentan celo durante las estaciones de primavera y verano, es decir cuando la concentración de melatonina sérica es baja (0.53 ± 0.1 ng/ml). Por el contrario las gatas presentan un anestro estacional en otoño e invierno, es decir cuando la concentración de melatonina sérica es alta (8.94 ± 2.6 ng/ml) (Vieytez, 1995; Stornelli, 2007). Sin embargo bajo un régimen lumínico artificial de 14 h de luz diarias, las gatas, ciclan durante todo el año y presentan ciclos estrales comparables a los ocurridos durante la época del año en la que ocurren días largos (Robledo y col., 2003; Giménez y col., 2006). Por el contrario, si las gatas son expuestas a un régimen lumínico diario corto (8 h luz/diarias), la actividad ovárica cesa y consecuentemente la hembra entra en anestro (Leyva y col., 1989).

Pubertad

La mayoría de las hembras felinas alcanzan la pubertad entre los 6 y 9 meses de edad (Verstegen, 1998; Esteve, 1992). Esto varía debido a la influencia de varios factores, entre ellos la época del año en que la hembra nace. Se ha informado que aquellas hembras que nacen en invierno alcanzan la pubertad en la primavera siguiente por lo cual comienzan su actividad sexual más tempranamente que aquellas que nacen en verano que no presentarán celos hasta el año siguiente (Tsutsui y col., 2004). Por otro lado, la madurez sexual presenta cierta heredabilidad, es así que razas de pelo corto son más precoces que las razas de pelo largo (Povey, 1978). Otro factor a considerar es el peso, ya que las hembras necesitan un peso mínimo de 2.3 a 2.5 kg para llegar a la pubertad (Verstegen, 2002).

Estadíos del ciclo estral: endocrinología y citología vaginal

El ciclo estral felino se divide en cuatro estadíos: proestro, estro, interestro y anestro [Figura 1] (Johnston y col., 2001). El proestro, es el estadío del ciclo estral cuya duración puede ser tan breve (24 h) que pasa inadvertido o durar 1 a 2 días (Johnson, 2000). Es el momento de actividad folicular (síntesis y secreción de estrógenos [E_2]), cambios en la citología vaginal y preparación para el apareamiento y preñez (Feldman y Nelson, 2000). Los folículos ováricos desarrollan desde un diámetro aproximado de 0.5 mm a 1.5 mm durante este estadío (Esteve, 1992). Los E_2 , llegan a concentraciones superiores a 20 pg/mL, siendo los niveles plasmáticos

de esta hormona en anestro o interestro inferiores a 15 pg/mL (Feldman y Nelson, 2000). El aumento de las concentraciones séricas de E_2 se relaciona con el comportamiento afectuoso de la hembra, y características conductuales particulares (fricciones, pisoteo con los miembros posteriores, vocalizaciones y menor hostilidad hacia el macho) presentes en esta etapa del ciclo estral. En este estadio si bien la hembra atrae al macho, no permite la monta (Johnson, 2000).

El estro es el momento en que la hembra acepta el servicio, y la síntesis y concentración sérica de E_2 llega a los niveles más altos, 40 a 80 pg/mL (Verstegen, 2002). La duración promedio de este período es de 6 a 10 días (Esteve, 1992). Debido a las altas concentraciones de E_2 plasmático, la gata aumenta las vocalizaciones, presenta lordosis, mantiene la cola hacia un lado y acepta la cópula (Johnson, 2000). Este aumento de los E_2 , no sólo produce un cambio del comportamiento, sino que también actúa sobre el epitelio vaginal produciendo la cornificación del mismo (Johnston y col., 2001). En consecuencia, la citología vaginal de la fase folicular (proestro y estro) presenta células superficiales nucleadas y anucleadas. Las células superficiales son grandes, de bordes irregulares, núcleo oval y picnótico o sin núcleo [Tabla 1] (Esteve, 1992).

Una particularidad de las hembras felinas es que la ovulación es inducida por el coito. La estimulación vaginal producida por el pene del macho es seguida en forma inmediata por un incremento en la actividad neural dentro de las áreas hipotalámicas (Verstegen, 2002). La mencionada estimulación causa liberación de GnRH, seguida por una onda de LH, mediado por la estimulación vaginal. Las ondas de LH se presentan a los 15 minutos de la cópula. Los niveles máximos de LH requieren entre 8 a 12 cópulas y se alcanzan 4 h después de ocurrido el primer coito. La ovulación ocurre aproximadamente a las 24 h después de la rápida liberación de LH (Felman y Nelson, 2000). Los valores de esta hormona van desde 10 ng/mL antes del apareamiento a más de 100 ng/mL después de la estimulación máxima (Verstegen, 2002). Algunas gatas pueden no liberar adecuadas concentraciones de LH para inducir la ovulación a pesar de repetidas cópulas con machos fértiles (Johnson, 2000). La adecuada secreción de LH postestimulación vaginal no siempre inducirá la ovulación. Es probable que una cierta madurez intrínseca del folículo en desarrollo sea prerrequisito para que el estímulo coital que permite la ovulación sea efectivo (Johnson, 2000).

Se ha observado que un 35 % de las hembras felinas pueden presentar ovulación espontánea (Johnson, 2000). Esto ocurre en aquellas colonias de gatos en que las hembras están confinadas en el mismo ambiente que los machos, a pesar de que no haya contacto físico ni visual. Esta observación se puede atribuir al efecto de las feromonas tal como ocurre en otras especies (Verstegen, 1998).

En ausencia de apareamiento u ovulación espontánea comienza la etapa llamada interestro, la cual es definida como la etapa que le sigue a un estro y precede al proestro siguiente. La duración de este estadio varía de 8 a 10 días promedio (Feldman y Nelson, 2000). Mediante citología vaginal puede observarse un predominio de células intermedias, células superficiales

en menor proporción y ocasionalmente pueden visualizarse neutrófilos. Las células intermedias son más pequeñas que las células superficiales, con contornos celulares regulares y núcleo redondo u oval, el cual puede estar picnótico [Tabla 1] (Esteve, 1992).

Si ocurre ovulación pero los ovocitos no son fertilizados, los folículos se luteinizan y se forman cuerpos lúteos que secretan P_4 . La fase luteal es más corta que la gestación, y se denomina pseudogestación (Verstegen, 1998). En esta etapa, la concentración de P_4 sérica llega a niveles de más de 20 ng/mL (Wildt y col., 1980; Schmidt y col., 1983). Sin embargo, la concentración de P_4 comienza a descender alrededor del día 25 llegando a valores basales entre los 30 y 40 días, por lo tanto los cuerpos lúteos de la pseudopreñez estarían pre-programados a sufrir atrofia después de los 25-35 días al no existir un soporte luteotrófico proveniente del embrión o placenta (Verstegen, 1998). Al final de la pseudogestación existe un período breve de interestro que precede al siguiente estro, siempre y cuando las gatas estén en etapa reproductiva (Verstegen, 1998). En consecuencia la duración del estadio de pseudogestación es aproximadamente de 40 días (Wildt y col., 1980; Schmidt y col., 1983). En esta fase la citología vaginal presenta las mismas características que la citología de interestro.

El anestro es el estadio caracterizado por la ausencia de ciclos estrales. Esta fase ocurre cuando disminuyen las horas luz con el consiguiente aumento de melatonina y prolactina (Banks y Stabenfeldt, 1983). Las concentraciones séricas de melatonina y prolactina son sincrónicas, se elevan durante los períodos de oscuridad y disminuyen durante los períodos de gran intensidad lumínica (Verstegen 1998; Leyva, 1989). Por lo tanto, el anestro felino se caracteriza por niveles elevados de melatonina y prolactina, y niveles basales de E_2 y P_4 (Verstegen, 1998). En esta etapa, la citología vaginal presenta predominio de células parabasales y una escasa cantidad de células intermedias (Colby, 1980). Las células parabasales se caracterizan por ser redondas, con bordes celulares regulares y poseer una relación núcleo-citoplasma disminuida [Tabla 1] (Esteve, 1992).

Bibliografía

- Banks, DR.; Stabenfeldt, GH. (1983) "Prolactin in the cat: II Diurnal patterns and photoperiod effects". Biol Reprod. (28) pp. 933-939.
- Colby, ED. (1980). "*The estrous cycle and pregnancy*". En: Morrow DA, editor. Current therapy in theriogenology. (pp. 832-839). Philadelphia: W.B. Saunders Co.
- Esteve, PA. (1992). "Frottis vaginaux chez la chatte. Les indispensables de L'animal de compagne". P.M.C.A.C. Paris. pp. 59-65.
- Feldman, EC.; Nelson, RW. (2000). "*Reproducción de gatos*". En: Feldman EC, Nelson RW. Endocrinología y reproducción en perros y gatos. 2da Edición. (pp. 806-836). México, Mc Graw-Hill Interamericana.
- Giménez, F.; Stornelli, MC.; Savignone, CA.; Tittarelli, CM.; de la Sota, RL.; Stornelli, MA. (2006). "Reproductive physiology and contraception in queen". Anal Vet. (26) pp. 38-43.
- Johnson, CA. (2000). "*Anormalidades del ciclo estral*". En: Nelson RW, Couto GC, editores. Medicina interna de animales pequeños. 2da Edición. (pp. 891-917). Buenos Aires, Argentina. Ed. Inter.-Médica.
- Johnston, SD.; Root Kustritz, MV.; Olson, PNS. (2001). "*The queen*". En: Johnston, SD.; Root Kustritz, MV.; Olson, PNS. Canine and feline theriogenology. (pp. 389-495). Philadelphia, London, New York, St. Louis, Sydney, Toronto: W.B. Saunders Company.
- Leyva, H.; Madley, T.; Stabenfeldt, GH. (1989). "Effect of light manipulation on ovarian activity and melatonin and prolactin secretion in the domestic cat". J Reprod Fertil Suppl. (39) pp. 125-133.
- Povey, R. (1978). "Reproduction in the pedigree female cat. A survey of breeders". Can Vet J. (19) pp. 207-213.
- Robledo, MAM.; Carneiro, M.; Raratella-Evêncio, L.; Evêncio-Neto, J.; (2003). "Avaliação do fotoperíodo na indução do estro em gatas domésticas". Rev Bras Reprod Anim. 27(2) pp. 274-275.
- Scheer, FA.; Czeisler, CA. (2005). "Melatonin, sleep, and circadian rhythms". Sleep Med Rev. (9) pp. 5-9.
- Schmidt, PM.; Chakraborty, PK.; Wildt, DE. (1983). "Ovarian activity, circulating hormones and sexual behavior in the cat. II. Relationships during pregnancy, parturition, lactation and the postpartum estrus". Biol Reprod. (28) pp. 657-671.
- Stornelli, MA. (2007). "Physiological aspects of feline reproduction". Braz J Anim Reprod. 31 (1) pp. 71-76.
- Tsutsui, T.; Nakagawa, K.; Hirano, T.; Nagakubo, K.; Shinomiya, M.; Yamamoto, K.; Hori, T. (2004). "Breeding season in female cats acclimated under a natural photoperiod and interval until puberty". J Vet Med Sci. (66) pp. 1129-1132.

- Verstegen, JP. (2002). *"Reproducción felina"*. En: Ettinger SJ, Feldman EC, editores. Tratado de medicina interna veterinaria. 5ta Edición. (pp. 1764-1780). Buenos Aires, Argentina. Ed. Inter-Médica.
- Verstegen, JP. (1998). *"Physiology and endocrinology of reproduction in female cats"*. En Simpson GM, England GCW, Harvey M, editores. Manual of small animal reproduction and neonatology. (pp. 11-16) United Kingdom, British Association.
- Vieytes, MR. (1995). *"La glándula pineal"*. En: García Sacristán A. (Ed.). Fisiología veterinaria. (pp. 696-706). Mexico, DF: Interamericana McGraw-Hill.
- Wildt, DE.; Seager, SW.; Chakraborty, PK. (1980). "Effect of copulatory stimuli on incidence of ovulation and on serum luteinizing hormone in the cat". Endocrinology. (107) pp. 1212-1217.

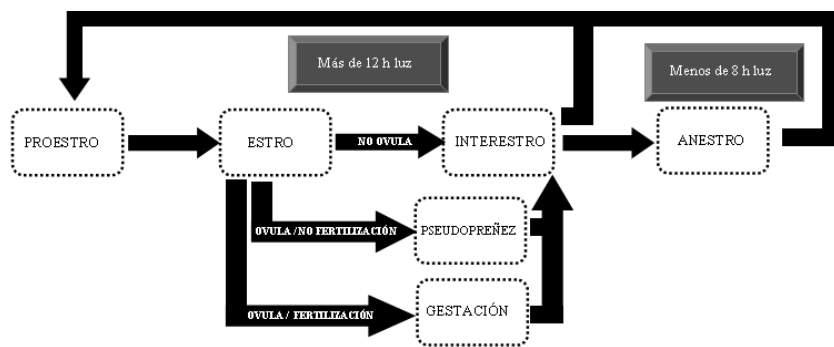

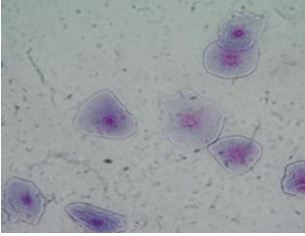
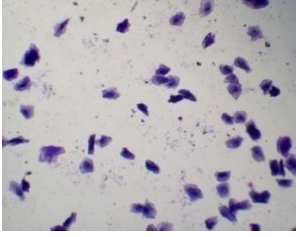
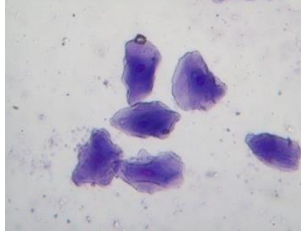
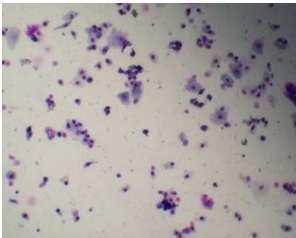
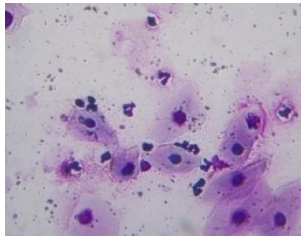
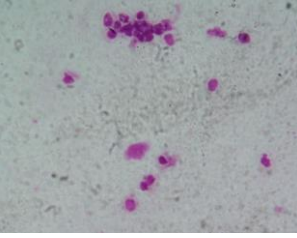
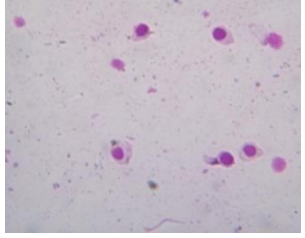


Figura 1. Ciclo estral en la gata doméstica

Tabla 1. Imágenes a 10 X y 40 X de citologías vaginales de gatas teñidas con Tinción 15 (Biopur®).

ESTADIO	IMAGEN A 10X	IMAGEN A 40X
PROESTRO		
ESTRO		
INTERESTRO		
ANESTRO		

CAPITULO 5

Fisiología del servicio canino

María Alejandra Stornelli - María Florencia García

Particularidades del servicio canino

Los machos jóvenes exhiben conductas de monta y empuje con sus compañeros de camada desde edad muy temprana (4-5 semanas). Estas actitudes son normales y sirven para el aprendizaje de las conductas del apareamiento propias del macho. Esta etapa del período de sociabilización es sumamente importante. Sin embargo, cuando es separado del resto de la camada, debe interrelacionarse con otros caninos (machos y hembras) para completar el período de sociabilización y evitar problemas futuros. Un macho que no ha cumplido con estas etapas tendrá a futuro problemas para interrelacionarse con la hembra y en muchas ocasiones nunca podrá realizar un servicio natural (Ettinger, 2006).

Las feromonas presentes en la descarga vulvar y orina de la hembra en celo atraen a los machos desde distancias considerables. Cuando la hembra en celo convive con el macho, este puede rehusarse a comer y beber por varios días. Algunos machos vocalizan ladrando o aullando constantemente. Otros exhiben conductas destructoras tratando de pasar por puertas y ventanas para encontrarse con la hembra (Ettinger, 2006; Bonagura, 2009).

Cuando un macho se enfrenta a una hembra en celo, comienza una interacción entre los dos animales en la que el macho adopta conductas diferentes dependiendo de su edad, carácter y experiencia previa en servicios. Se aproxima a la hembra, con orejas erguidas y cola

erecta, olfatea y lame su cara y periné (Foto 1). Si la hembra está receptiva, inmediatamente trata de montarla luego de un corto juego. Si permite la monta, el macho la sujeta por los flancos, avanza hacia delante y comienza a realizar movimientos de empuje con su pelvis (Foto 2). Si la hembra está poco dispuesta a aceptarlo, el macho inicia un juego de provocación intentando montar a la hembra en repetidas ocasiones hasta lograrlo o darse por vencido. Un macho experimentado, usualmente orienta el pene con movimientos controlados para localizar el orificio vulvar. La erección de la parte larga del glande cuenta con el soporte del hueso peneano que hace posible la intromisión. El contacto con la vulva desencadena intensos movimientos de empuje. Una vez que el pene está dentro de la vulva los movimientos se hacen más fuertes e intensos. Usualmente, el macho, acompañando estos movimientos, eleva alternativamente uno y otro miembro posterior (movimiento de zapateo). Previo a la intromisión y durante el inicio de esta fase se eyacula la fracción pre espermática. Cuando el pene alcanza la erección completa (ya dentro de la vagina de la hembra) se produce la eyaculación de la fracción espermática, lo cual dura 1 o 2 minutos. Los movimientos de empuje cesan cuando finaliza la eyaculación de esta fracción o durante la emisión de la porción final de la misma. Conjuntamente, el macho pasa un miembro posterior sobre la grupa de la hembra, así ambos animales quedan enfrentados por las colas (fase de abotonamiento). El pene sufre una flexión de 180 grados dentro de la vulva que gracias a la elasticidad del mismo por detrás del bulbo no causa molestias ni lesiones al macho. No todos los perros rotan sobre la hembra, algunos prefieren quedar paralelos y otros sobre la perra (Foto 3). Esto puede causar molestias en la hembra sobre todo si el macho es muy pesado o el servicio demasiado largo, es así que se recomienda desmontar suavemente al animal. Durante la fase de abotonamiento se eyacula la fracción prostática. La duración de esta es de 10 a 45 minutos. La hembra experimentada permanece parada y quieta durante la monta, intromisión y abotonamiento. Ocasionalmente la hembra puede intentar caminar arrastrando al macho con ella. Es importante sujetar a la hembra para que permanezca quieta y evitar así lesiones en uno o ambos animales. Al final del abotonamiento el bulbo del pene pierde la ingurgitación, disminuye el tamaño y el macho se separa de la hembra. El perro usualmente lame su pene mientras este se retrae dentro del prepucio. En ocasiones el prepucio puede invaginarse ocasionando dolor y el macho requiere ser asistido. Paralelamente la hembra lame vigorosamente su vulva (aseo) ya que existe cierta descarga de semen (Kustritz, 2003; England, 2004; Ettinger, 2006).

Mecanismos fisiológicos de erección y eyaculación

La erección y eyaculación son procesos fisiológicos complejos en los cuales se interrelacionan mecanismos neuromusculares, endócrinos y vasculares. Cualquier factor que

afecte o interrumpa alguno de estos mecanismos alterará la erección y eyaculación del reproductor afectando su capacidad de cópula.

El reflejo de erección y eyaculación puede desencadenarse por el impulso sensorial que ocurre con la presencia de una hembra en celo. En los reproductores muy entrenados en la realización de servicios o acostumbrados a la extracción manual de semen, el reflejo puede desencadenarse por el manejo propio del animal en el momento de servicio o extracción. La erección y eyaculación pueden ser provocadas por estimulación del nervio pélvico. Esta es la vía neurológica estimulada cuando se realiza obtención de semen por medio de electroeyaculador.

Gracias al estímulo inicial que desencadena el reflejo de erección se produce el aflujo de sangre a los cuerpos cavernosos (erección incompleta), que junto con la presencia del hueso peneano brindan la rigidez que permite la intromisión del pene dentro de la vagina de la hembra. Este aflujo sanguíneo hacia los cuerpos cavernosos se produce por la dilatación de las arterias pudenda interna y externa. La contracción de los músculos isquiouretrales impiden el retorno venoso lográndose la erección. Luego de la penetración ocurre la estimulación de las terminaciones nerviosas sensitivas peneanas, por la temperatura y presión que ejerce la vagina sobre el pene. En el perro, la presión es relativamente más importante que la temperatura en el desarrollo de la erección. En esta fase se produce la ingurgitación completa de la porción larga y del bulbo del glande, lo cual determina la fijación del pene dentro de la vagina. La erección completa implica la elongación del glande del pene, y la tumefacción del bulbo del glande, esto último es pre-requisito para la fijación del pene dentro de la vulva.

Cuando se alcanza la erección completa el semen es emitido hacia la uretra prostática. Esto ocurre por estimulación simpática α adrenérgica desde la región T12 -T13 del tronco simpático vía nervio hipogástrico. El cuello vesical se cierra y el esperma es impulsado a través de la uretra pélvica gracias a la contracción de los músculos bulbocavernoso e isquiocavernoso, siendo expulsado por el orificio uretral externo. Este es el proceso que se conoce como eyaculación (Ettinger, 2006; Johnston, 2001).

Bibliografía

- Bonagura JD; Twedh DC. (2009). Kirk's Current Veterinary Therapy XIV. Elsevier. St Louis. Missouri. USA.
- England G; Harvey M. (2004). Small Animal Reproduction and Neonatology. British Small Animal Veterinary Association
- Ettinger S J. (2006). Tratado de Medicina Interna Veterinaria. Elsevier. St Louis. Missouri. USA.
- Johnston S; Root Kustritz M; Olson P., (2001). Canine and Feline Theriogenology. Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- Kustritz M VR. (2003). Small Animal Theriogenology. Butterwoth Heinemann. St Louis. Missouri. USA.



Foto 1: El macho reconoce a la hembra en celo



Foto 2: Monta



Foto 3: Abotonamiento

CAPÍTULO 6

Fisiología del servicio felino

Romina Nuñez Favre

Los gatos domésticos en condiciones naturales presentan estacionalidad reproductiva en relación a la localización geográfica en la que se encuentren. En zonas templadas, en donde existen variaciones en la cantidad de horas luz diaria a lo largo del año, las gatas presentan actividad ovárica durante los días que presentan mayor cantidad de horas luz, es decir desde finales del invierno hasta mediados del otoño, cuando la cantidad de horas luz diaria disminuye (Hurni 1981, Tsutsui y col. 2004). Durante este periodo las gatas exhibirán ciclos estrales repetidos cada 14 a 19 días en promedio (4-30 días) de no mediar gestación, pseudogestación o enfermedad (Root y col. 1995, Gimenez y col. 2006). Las gatas poseen ovulación inducida por el coito, siendo necesario varios estímulos coitales para inducir una onda de LH de suficiente intensidad para inducir la ovulación, la cual se producirá 29-40 horas posteriores al pico de LH (Johnston y col. 2001). Esta particularidad de las hembras felinas favorece las cópulas múltiples y por lo tanto la mezcla de semen de múltiples machos, por lo que una camada de cachorros puede poseer uno o varios padres. El mencionado hecho es denominado “multifecundación”. Así mismo la gata puede presentar celo, aceptar al macho y ovular durante una gestación de tal manera que en el útero pueden coexistir fetos de diferente edad gestacional. Este fenómeno es llamado “multifetación” (Foto 1). Es de destacar que en condiciones naturales los gatos prefieren realizar la monta durante la noche. Así mismo, los gatos pueden tener preferencia por alguna hembra en particular, así como también pueden rechazar la monta aun cuando la hembra se encuentre receptiva (Lea Voith 1980). Cuando varias hembras entran en celo en el mismo periodo de tiempo, es decir sus ciclos están sincronizados, el macho dominante debe elegir entre defender a la hembra a la cual está

cortejando hasta el final de su celo o dejarla para servir a otras hembras; en este momento otros machos competidores en el grupo pueden servir a esas hembras. Por el contrario, cuando las hembras tienen sus ciclos de forma no sincronizada, el macho dominante del grupo puede invertir más tiempo en cortejar y montar a una hembra por vez, por lo que realiza mayor cantidad de servicios y tiene mayor probabilidad de obtener descendencia (Say y col. 2001).

Durante la temporada reproductiva, la hembra en celo vocaliza advirtiendo a los machos adyacentes de su presencia. Esta información también es transmitida químicamente a través de feromonas secretadas por las glándulas anales y de la cola y orina de las hembras (Lea Voith 1980). Las feromonas también están presentes en el espray urinario de los machos y son utilizadas en la demarcación territorial. El reflejo de Flehmen puede observarse en ambos sexos, mediante este reflejo se evalúan los diferentes olores a través del órgano vomeronasal. Los gatos que exhiben el reflejo de Flehmen se mantienen quietos con la boca abierta 1 cm y cerrando los ojos mientras olfatea durante 1 a 5 segundos, de esta forma evalúan los olores de objetos inanimados, de la atmosfera, así como los de otros gatos. La reacción de Flehmen en el macho es influenciada por la presencia de testosterona. Se cree que de esta forma los gatos solitarios se mantienen informados de la presencia y estatus reproductivo de los (Lea Voith 1980, Johnston y col. 2001).

Una hembra en celo es cortejada por varios machos durante 12 a 96 horas antes de elegir y aceptar a uno. El macho se acerca a la hembra en celo, toca su nariz con la suya y luego investiga su región perineal. Generalmente el macho emite un fuerte maullido antes de realizar la monta, luego agarra la piel de la parte dorsal del cuello de la hembra con sus dientes sin lastimarla, de esta manera el macho se estabiliza y posiciona a la hembra para la monta (Foto 2). Una vez que toma a la hembra por el cuello, la monta y comienza la actividad de pisoteo a la vez que se desliza hacia abajo con sus patas traseras con el fin de posicionar el pene apropiadamente para la intromisión (Foto 3). La hembra también realiza pisoteo con sus patas traseras, de forma de estimular al macho. En el gato la intromisión y eyaculación dura solo unos segundos. El tiempo promedio entre que el macho toma a la hembra por el cuello y la monta va desde los 5 a 50 segundos, para la intromisión y eyaculación 1 a 30 segundos. Inmediatamente después de eyacular el macho relaja la sujeción del cuello de la hembra, desmonta en menos de un segundo. La hembra emite un grito cuando ocurre la eyaculación, inmediatamente se da vuelta y ataca al macho, el que se aleja rápidamente. La hembra liberada exhibe la reacción poscoital, en la cual gira y lame frenéticamente su vulva, se cree que de esta forma estimula el movimiento anterógrado de los espermatozoides. Durante este periodo el macho la observa desde una distancia prudencial. Una vez finalizada la reacción poscoital, el macho se acerca y la monta nuevamente. Las montas continúan aproximadamente siete veces cuando el macho agotado se retira y es remplazado por otro nuevo (Lea Voith 1980, Johnston y col. 2001, Root Kustritz 2005).

La monta puede no realizarse si el macho se encuentra en un ambiente extraño; acostumbrar a un macho a un nuevo ambiente puede llevar de 1 a 2 meses, debido a que la

intimidación por parte de otros machos disminuye su libido. La monta tampoco se realizará si el macho no puede agarrar firmemente a la hembra por el cuello, o si la libera cuando la hembra grita, lo cual es frecuente en machos inexpertos. En ocasiones se forma un anillo de pelos rodeando el prepucio que puede impedir la intromisión y, como consecuencia, la monta ya que el servicio resulta en varios saltos infructuosos (Johnston y col. 2001). Cuando se desea entrenar a machos reproductores jóvenes, es beneficioso utilizar hembras experimentadas, receptivas y pacientes. Así mismo es conveniente proveerles un ambiente en el cual se sientan seguros y de ser posible, tener una habitación que se utilice solo con fines de servicios genera confianza en el nuevo reproductor.

El comportamiento agresivo entre los gatos machos ocurre, como ocurre en machos de cualquier otra especie, con el fin de marcar dominancia sobre las hembras en celo. Estas peleas territoriales se relacionan con lesiones de distintos grados, hecho que impulsa a la castración del 80-90% de los gatos mascotas. El comportamiento social relacionado con el apareamiento generalmente cesa después de la castración, pero puede mantenerse por varios años después de la cirugía en machos experimentados mientras que, la mayoría de los animales castrados prepúberes no exhiben tal comportamiento (Rosenblatt y Aronson 1958, Johnston y col. 2001).

El comportamiento copulatorio normal en el gato macho, es el resultado de la percepción de estímulos visuales, auditivos y olfatorios de la hembra en celo, de la presencia de testículos funcionales así como de la integridad del eje hipotálamo-hipofisiario-gonadal. El glándulo del pene está cubierto por espículas sensibles a andrógenos, las cuales son parte de los caracteres sexuales secundarios del gato. Estas espículas reflejan el nivel de testosterona en felinos. Las espículas se encuentran dirigidas hacia la base del pene, comienzan a crecer a partir de los 2 meses de vida y su máximo desarrollo se alcanza luego de alcanzada la pubertad, entre los 6-7 meses de edad. Cuando un gato es castrado, los niveles de testosterona descienden paulatinamente, este descenso hormonal es acompañado por una disminución en el tamaño de las espículas, desapareciendo las mismas 6 meses posteriores a la castración (Aronson y Cooper 1967).

Cada una de las espículas del pene del gato posee mecanorreceptores, que son las terminales nerviosas derivadas del nervio dorsal del pene, necesarios para orientar el empuje pélvico en la intromisión (Cooper 1972).

Erección y eyaculación

En el gato, la erección y la eyaculación de semen están mediadas por nervios simpáticos, parasimpáticos y somáticos. La erección es producida por la estimulación de las fibras parasimpáticas provenientes de las raíces de los segundos nervios sacros. Subsecuentemente se estimula el tronco simpático L1-2 y el nervio hipogástrico (simpático) los cuales estimulan la

emisión del fluido seminal dentro de la uretra y estimulan al nervio pudendo interno (simpático, somático y parasimpático), resultando la eyaculación. Una vez producida la eyaculación, la relajación del pene es el resultado de la estimulación de la vía simpática (Johnston y col. 2001) . Dooley y col. han observado que durante la electroeyaculación parte del eyaculado es desviado hacia la vejiga debido a eyaculación retrograda. Este hecho se ha observado también en montas naturales o en extracciones seminales mediante vagina artificial, sugiriendo que la eyaculación retrograda sería parte del proceso normal de eyaculación en el gato doméstico (Dooley y col. 1991, Zambelli y Cunto 2006).

Bibliografía

- Aronson, L. R. y Cooper, M. L. (1967). "Penile spines of the domestic cat: their endocrine-behavior relations." *Anat Rec* 157 (1), pp. 71-78.
- Cooper, K. K. (1972). "Cutaneous mechanoreceptors of the glans penis of the cat." *Physiol Behav* 8 (5), pp. 793-796.
- Dooley, M. P.; Pineda, M. H.; Hopper, J. G. y Hsu, W. H. (1991). "Retrograde flow of spermatozoa into the urinary bladder of cats during electroejaculation, collection of semen with an artificial vagina, and mating." *Am J Vet Res* 52 (5), pp. 687-691.
- Gimenez, F.; Stornelli, M. C.; Savignone, C. A.; Tittarelli, C. M.; de la Sota, R. L. y Stornelli, M. A. (2006). "Fisiología reproductiva y control de los ciclos estrales en la gata doméstica." *Analecta Veterinaria* 26 (1), pp. 38-43.
- Hurni, H. (1981). "Daylength and breeding in the domestic cat." *Lab Anim* 15 (3), pp. 229-233.
- Johnston, S. D.; Root Kustritz, M. y Olson, P. (2001). *Canine and Feline Theriogenology*. (1st.). Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- Lea Voith, V. (1980). "Male Reproductive Behavior". En *Current Therapy in Theriogenology*. (pp. 1287). Philadelphia, PA.: W.B. SAUNDERS COMPANY.
- Root Kustritz, M. V. (2005). "Reproductive behavior of small animals." *Theriogenology* 64 (3), pp. 734-746.
- Root, M. V.; Johnston, S. D. y Olson, P. N. (1995). "Estrous length, pregnancy rate, gestation and parturition lengths, litter size, and juvenile mortality in the domestic cat." *J Am Anim Hosp Assoc* 31 (5), pp. 429-433.
- Rosenblatt, J. y Aronson, L. (1958). "The Decline of Sexual Behavior in Male Cats after Castration with Special Reference to the Role of Prior Sexual Experience." *Behaviour* 12 (4), pp. 285-338.
- Say, L.; Pontier, D. y Natoli, E. (2001). "Influence of oestrus synchronization on male reproductive success in the domestic cat (*Felis catus* L.)." *Proc Biol Sci* 268 (1471), pp. 1049-1053.
- Tsutsui, T.; Nakagawa, K.; Hirano, T.; Nagakubo, K.; Shinomiya, M.; Yamamoto, K. y Hori, T. (2004). "Breeding season in female cats acclimated under a natural photoperiod and interval until puberty." *J Vet Med Sci* 66 (9), pp. 1129-1132.
- Zambelli, D. y Cunto, M. (2006). "Semen collection in cats: techniques and analysis." *Theriogenology* 66 (2), pp. 159-165.

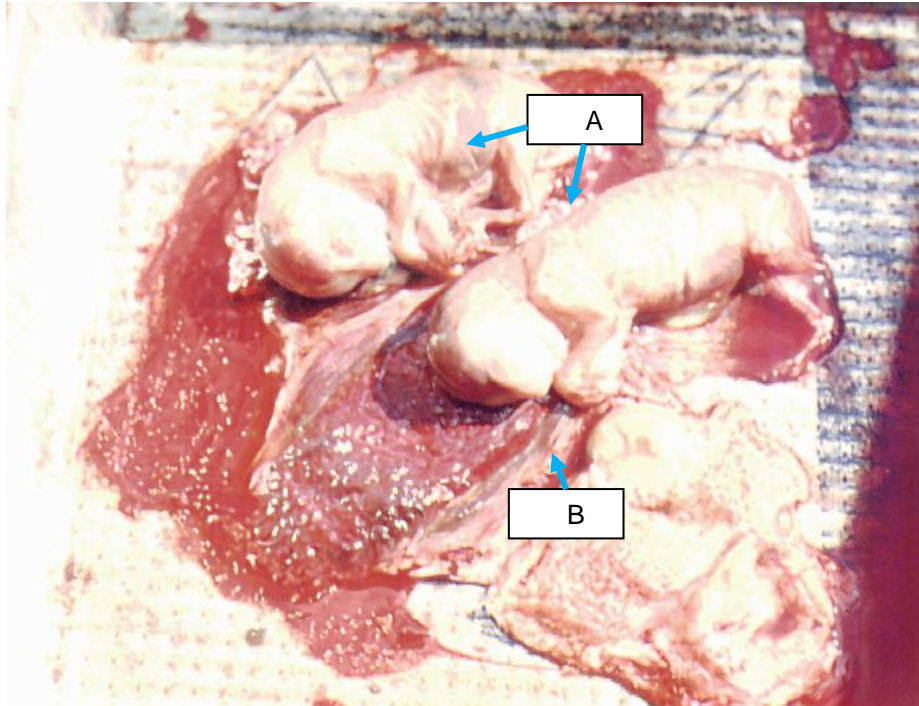


Foto 1: Multifetación. Fetos de 50 días de gestació (A). Fetos de 30días de gestación (B)



Foto 2: El macho sujeta a la hembra mordiendo el pliegue dorsal del cuello



Foto 3: Monta

CAPÍTULO 7

Organización y endocrinología del aparato reproductor masculino

Romina Nuñez Favre

Testículos

Los testículos son órganos pares, extra abdominales, que se encuentran dentro de una estructura cutánea en forma de saco denominada escroto, el cual tiene la función de proteger, sostener y mantener la temperatura adecuada para la espermatogénesis (Senger 2003). En los gatos, los testículos se encuentran descendidos en el escroto al nacimiento, aunque permanecen móviles a través del canal inguinal hasta la pubertad (7-10 meses de edad). Se encuentran ubicados en la región perineal, ventral al ano (Johnston y col. 2001). En los gatos adultos son estructuras esféricas a ovoideas con una medida aproximada de 1,5 x 1,0 x 1,0 cm y un peso promedio de 1,17 gramos (Johnston y col. 2001, Franca y Godinho 2003). Recientemente se ha documentado la estacionalidad reproductiva en el gato doméstico. Si bien el gato doméstico presenta una producción espermática continua a lo largo del año, se evidencia una mejora de la calidad seminal durante los meses que presentan mayor cantidad de horas luz diaria, en coincidencia con la estación reproductiva de la hembra. Estas variaciones estacionales son acompañadas por cambios a nivel testicular, encontrándose los

mayores volúmenes y pesos testiculares durante los meses de primavera-verano (Kirkpatrick 1985, Praderio y col. 2012).

Los testículos se definen como una glándula mixta o de doble secreción, poseen una secreción exócrina o citócrina, es decir excretan células o espermatozoides y una secreción endócrina, en relación a la producción hormonal. Las células de Leydig (intersticiales) secretan testosterona (T_2) en respuesta a la estimulación de la hormona luteinizante (LH). Las células de Sertoli sintetizan y secretan inhibina y activina, dos hormonas proteicas que, junto con T_2 , ejercen un feedback negativo sobre el eje hipotálamo-hipofisiario-gonadal controlando de esta forma la secreción de gonadotrofinas LH y FSH (hormona folículo estimulante) y consecuentemente la producción espermática.

Dentro del escroto, los testículos están rodeados por la túnica vaginal, formada por una evaginación del peritoneo, cubiertos a su vez, por una evaginación de la fascia abdominal, la fascia espermática. La túnica vaginal está formada por dos capas u hojas: la parietal (externa) y la visceral (interna); esta última se refleja en la cara posterior del órgano, el tejido conjuntivo de esta capa se continúa con una cápsula conjuntiva densa, la túnica albugínea, que cubre al testículo. La túnica albugínea envía proyecciones hacia el parénquima testicular, que se unen en el mediastino testicular, dejando a su paso septos de tejido conjuntivo que forma los lóbulos testiculares, los cuales contienen a los túbulos seminíferos. Entre los septos de tejido conjuntivo queda formado el *compartimento intersticial*: conformado por vasos sanguíneos y linfáticos, nervios, células propias del tejido conjuntivo y células intersticiales de Leydig (Senger 2003).

Los túbulos seminíferos están formados por una porción tortuosa donde se lleva a cabo la espermatogénesis, y una porción recta la cual se conecta con los túbulos rectos de la rete testis (en el mediastino testicular); los que continúan como conductos aferentes transportando a los espermatozoides junto con el fluido testicular hacia el epidídimo (Senger 2003). Los túbulos seminíferos están compuestos por una membrana basal sobre la que apoya el epitelio seminal o seminífero. El epitelio seminífero consta de dos grupos celulares: las células de Sertoli y las células germinativas o hilera seminal.

Las células de Sertoli son las únicas células somáticas del epitelio seminífero, fueron descritas por primera vez en 1865 por Enrico Sertoli y desde entonces muchos científicos han estudiado su función en la espermatogénesis (Griswold 1998). Durante la formación testicular embrionaria, las células de Sertoli secuestran a las células germinales dentro de los recientemente formados túbulos seminíferos. Una vez formado el testículo, tanto las células de Sertoli como las células germinales experimentan una rápida proliferación celular hasta la pubertad. En este momento, cesan las mitosis de las células de Sertoli, se forman los complejos de unión entre células adyacentes y las células germinales comienzan su diferenciación a espermatozoides (Griswold 1998).

Las células de Sertoli se encuentran apoyadas sobre la membrana basal del túbulo y son las encargadas de proveer sostén y nutrición a las células germinales en desarrollo, fagocitar

las células germinales defectuosas y cuerpos residuales y liberar a las espermatídes maduras mediante la espermiación. Además, sintetizan gran cantidad de proteínas y hormonas que regulan, en respuesta a hormonas hipofisarias, las divisiones mitóticas creando un microambiente adecuado para la espermatogénesis (Johnson y col. 2008). Dentro de las proteínas y hormonas sintetizadas por las células de Sertoli se encuentran:

- Proteína fijadora de andrógenos, mantiene las concentraciones de testosterona intratesticular necesarias para la espermatogénesis.
- Glicoproteínas sulfatadas, relacionadas con la adquisición de fertilidad y que proveen un efecto detergente que permite a las células y fluidos moverse a través del sistema tubular.
- Transferrina, proteína transportadora de hierro necesario para la espermatogénesis.
- Inhibina, hormona supresora de FSH.
- Estrógenos, necesarios para la normal espermatogénesis.

Las células de Sertoli son resistentes al calor, la radiación ionizante y a diferentes agentes tóxicos. Están fuertemente unidas en su superficie lateral con las adyacentes a través de complejos de unión (tight junctions). Los complejos de unión separan al epitelio germinal en dos compartimentos: el *compartimento basal*, que aloja a las espermatogonias y a los espermatocitos primarios recientemente formados, y el *compartimento adluminal*, donde se alojan los espermatocitos primarios, secundarios y las espermatídes durante su diferenciación (Johnston y col. 2001). Estos complejos de unión de las células de Sertoli forman parte de la *barrera hemato-testicular*. El otro componente de esta barrera es la lamina propia de los túbulos seminíferos, la cual está formada por la membrana basal del túbulo y, por fuera de la misma y dependiendo de la especie, una o más capas de células mioides contráctiles que poseen ciclos rítmicos de contracción y relajación los cuales facilitan el movimiento de los espermatozoides hacia la rete testis y conductos eferentes. En carneros, las células mioides están tan especializadas que su citoplasma se encuentra casi totalmente ocupado por filamentos contráctiles (Bustos-Obregon 1976).

La función principal de la *barrera hemato-testicular* es la de proteger a los espermatozoides en desarrollo de posibles agentes nocivos, debido a que solo están expuestos a moléculas que pasan a través de ella. Así mismo evita las reacciones autoinmunes contra las células germinales en desarrollo, debido a que previene que moléculas de alto peso molecular como inmunoglobulinas y células del sistema inmune (macrófagos y linfocitos) lleguen hasta el compartimento adluminal. Esta función es de gran importancia debido a que las células de la hilera seminal son inmunológicamente diferentes a otras células del cuerpo debido a que expresan antígenos de superficie particulares después de haber atravesado la primera meiosis (Johnston y col. 2001, Senger 2003, Johnson y col. 2008).

La cantidad de células germinales que alberga cada célula de Sertoli depende de la especie, pero permanece constante para esa especie. En el gato doméstico, por ejemplo, se han observado alrededor de 30 millones de células de Sertoli por gramo de testículo y cada célula alberga entre 8 y 10 células germinales (Franca y Godinho 2003).

Estructura histológica de los túbulos seminíferos

Los túbulos seminíferos están rodeados una o más capas de células mioides contráctiles. Interiormente a la capa celular descrita, se encuentra la membrana basal. El revestimiento del túbulo seminífero en el macho adulto es un complejo epitelio estratificado, denominado epitelio seminal. Como se mencionara anteriormente, este epitelio seminal consta de dos grupos de células: las células de Sertoli y las células espermatogénicas (Foto 1).

Las células de Sertoli apoyan sobre la membrana basal y se extienden a lo largo de todo el espesor del epitelio hasta su superficie libre. Forman una capa continua de células fuertemente unidas a través de los complejos de unión. En el gato doméstico adulto se han observado entre 12 y 14 células de Sertoli en un corte transversal de un túbulo seminífero (Nuñez Favre 2013). Poseen una forma compleja debido a que se adaptan a los contornos irregulares y cambiantes de las células germinales rodeándolas durante toda su diferenciación. El núcleo es grande, alrededor de 12 μm y de cromatina laxa, presenta una forma variable pudiendo ser oval, triangular o redondeado. El nucléolo es voluminoso. El citoplasma es pálido, más o menos piramidal, ocupa la totalidad de la pared del túbulo extendiéndose hasta la luz del mismo (Foto 2). Al microscopio electrónico pueden observarse mitocondrias alargadas y finas, paralelas al eje mayor de la célula, siendo más abundantes en la región media y apical. Cerca de la base se encuentran gotas de lípidos y lipofuccina. Ocasionalmente se encuentran gotas de glucógeno. El retículo endoplásmico rugoso (RER) es escaso, pero el retículo endoplásmico liso (REL) forma redes continuas, que pueden aparecer rodeando a las gotas de lípidos. El aparato de Golgi está bien desarrollado y existe una amplia variedad de lisosomas que pueden presentar pigmentos lipocromos. El citoesqueleto está bien desarrollado, existiendo filamentos intermedios en la zona perinuclear (Johnson y col. 2008)

Las espermátogonias pueden observarse cerca de la membrana basal. Tienen un tamaño de 12 μm , su núcleo es esférico, ocasionalmente elipsoidal y de 6,5 μm , presentando 1 o 2 nucléolos adheridos a la membrana nuclear. El citoplasma es homogéneo y pálido. Las espermátogonias atraviesan varias divisiones mitóticas para dar lugar a espermátogonias tipo B, las cuales se diferencian de las A porque su núcleo posee grumos de cromatina más gruesos y un nucléolo central. La división mitótica de las espermátogonias B dan origen a espermátocitos primarios.

Los espermátocitos primarios se parecen al principio a las espermátogonias que les dieron origen, pero a medida que se alejan de la membrana basal su citoplasma aumenta de tamaño. Casi inmediatamente después de su nacimiento, los espermátocitos primarios entran en una larga meiosis, en ese momento se puede ver su núcleo grande con los cromosomas en diferentes estadios de condensación y citoplasma acidófilo. Se reconocen estadios diferentes de espermátocitos primarios en *profase I*:

Preleptoténico: se observa el núcleo en interfase.

Leptoténico: la cromatina comienza a organizarse en cromosomas filamentosos finos.

Zigoténico: los cromosomas homólogos, que se han duplicado durante la interfase precedente, comienzan a juntarse por medio de la formación de complejos sinaptonémicos, proceso que se denomina sinapsis. Los cromosomas, son fácilmente visibles por su mayor enrollamiento que intensifica la tinción.

Paquiténico: se completa el emparejamiento de los cromosomas para formar los bivalentes o tétradas, continúa el proceso de acortamiento y enrollamiento, con lo que se forman cordones cromosómicos más gruesos. Los cromosomas duplicados pueden observarse ya como díadas o cromátidas hermanas que se mantienen unidas por sus centrómeros. Cada elemento paquiténico está formado por cuatro cromátidas. En esta fase tiene lugar la recombinación (crossing-over), en la cual las cromátidas de los cromosomas emparejados se intercambian mutuamente.

Diploténico: los cromosomas completan su acortamiento y desaparecen los complejos sinaptonémicos.

Estos estadios de la profase meiótica son extremadamente largos; en el gato doméstico, se ha observado que la vida media de un espermatocono primario es de aproximadamente 16 días (Franca y Godinho 2003). Por eso en cortes transversales de túbulos seminíferos pueden observarse varios espermatoconos en diferentes estadios de la profase. Durante la *metafase I* las tétradas se disponen en la placa ecuatorial y desaparece la membrana nuclear. En *anafase I* los centrómeros de cada par homólogo de cromosomas se desplazan hacia los polos opuestos del espermatocono, llevando con ellos a ambas cromátidas, es decir un cromosoma entero. Durante la *telofase I* la envoltura nuclear se reconstruye alrededor de los cromosomas. La anafase I y la telofase I terminan muy rápidamente, formando espermatoconos secundarios conteniendo la mitad del número de cromosomas (duplicados). Estos espermatoconos son células con núcleo esférico y laxo, de aproximadamente 8 µm de diámetro. Se observan muy pocas veces en los cortes histológicos porque permanecen muy poco tiempo en este estadio (aproximadamente 1,8 días) (Franca y Godinho 2003). Los espermatoconos secundarios comienzan rápidamente la segunda fase de la división meiótica con una corta *profase II* y *metafase II*. Durante la *anafase II* los centrómeros se dividen, como en la mitosis, permitiendo que las cromátidas hermanas se desplacen hacia polos opuestos de la célula. Al finalizar la meiosis en la *telofase II*, se forman espermátidas con una dotación haploide de cromosomas (Senger 2003, Hess y de Franca 2008). En un primer momento las espermátidas son células redondeadas pequeñas, con cierto desarrollo del aparato de Golgi y extenso REL. Su núcleo es un poco más pequeño que el de los espermatoconos secundarios (5-6 µm de diámetro) y de cromatina pálida. Estas células continuarán su diferenciación hacia espermátidas maduras durante aproximadamente 14 días (Franca y Godinho 2003).

En el *compartimento intersticial*, espacio comprendido entre los túbulos seminíferos, se observan células mioides rodeando a los túbulos seminíferos, vasos sanguíneos y linfáticos, nervios, células propias del tejido conjuntivo y células intersticiales de Leydig. Éstas son

particularmente importantes ya que, en respuesta a la estimulación de la hormona luteinizante (LH), sintetizan y secretan testosterona, la cual difunde hacia los túbulos seminíferos y junto con la hormona folículo estimulante (FSH), dirigen la espermatogénesis. En mamíferos, las células de Leydig están representadas por dos generaciones celulares: la primera generación, se desarrolla durante la vida fetal, su producción de testosterona es responsable de la diferenciación de los conductos de Wolffian en órganos reproductivos masculinos y la conversión de testosterona en dihidrotestosterona responsable de la masculinización del sistema urogenital masculino. La segunda generación de células de Leydig aparece durante la pubertad, a través de una división y diferenciación de las fetales. Las células de Leydig adultas, a diferencia de las fetales poseen receptores para LH y la testosterona que producen establece el inicio de la espermatogénesis y el mantenimiento de la función reproductiva del macho. Estas células normalmente no proliferan pero pueden regenerarse si ocurre destrucción de la población celular (Benton y col. 1995, Habert y col. 2001, Chen y col. 2009). Al microscopio de luz las células de Leydig adultas tienen forma poliédrica. El núcleo es redondeado, grande con la eucromatina condensada y presenta uno o dos nucléolos. El citoplasma es abundante, presenta un retículo endoplásmico liso y un aparato de Golgi muy desarrollados, abundantes mitocondrias e inclusiones lipídicas (Mendis-Handagama y Ariyaratne 2001, Haider 2004, Chen y col. 2009).

Espermatogénesis

La espermatogénesis comprende la serie de fenómenos por los cuales las espermatogonias se transforman en espermatozoides. Es un proceso altamente ordenado, que se lleva a cabo en los túbulos seminíferos. En el transcurso de esta tan especializada diferenciación celular ocurren lesiones, las cuales son marcadas y envían señales que detienen la progresión del ciclo celular para dar tiempo a la reparación de la misma con la apoptosis como una posible alternativa. Debido a que el proceso espermatogénico implica una elevada tasa de proliferación celular, las apoptosis son muy frecuentes. Es así que en ciertas especies, como ratas, conejos y más recientemente en gatos, en las cuales el proceso espermatogénico se ha estudiado con mayor detalle, se ha podido identificar que la muerte celular ocurre en estadios específicos del ciclo del epitelio seminífero, los cuales coinciden con aquellos estadios en los cuales la segunda, tercera y cuarta generación de espermatogonias atraviesan la mitosis. En cuanto al tipo celular, las apoptosis se han observado con mayor frecuencia en las espermatogonias, seguidas por los espermatoцитos primarios en zigotene y en metafase I (Blanco-Rodríguez 2002).

Para su mejor estudio el proceso espermatogénico puede dividirse en tres fases. En la *primera fase o fase de proliferación o espermatoцитogénesis*, las espermatogonias más

primitivas o tipo A_0 (también llamadas stem cells) proliferan por divisiones mitóticas dando lugar a otras espermatogonias A_0 o de reserva que permitirán que la espermatogénesis se mantenga por años, y a espermatogonias que continuarán dividiéndose mitóticamente dando lugar a varias generaciones espermatogonias A, cada una un poco más diferenciada que la precedente (espermatogonias A_1 , A_2 , A_3 , A_4). El número de divisiones mitóticas a las cuales se somete una espermatogonia es característico de cada especie, en el gato doméstico se ha identificado que una espermatogonia A atraviesa seis divisiones mitóticas para dar origen a una espermatogonia B (Blanco-Rodriguez 2002). Es importante destacar que estas espermatogonias son resistentes a la radiación e injurias tóxicas. Las espermatogonias B continúan su diferenciación, y luego de una nueva mitosis, darán origen a espermatocitos primarios que entrarán en la *segunda fase de la espermatogénesis o meiosis*. Durante esta fase la diversidad genética es garantizada debido a la replicación y recombinación del ADN que ocurre durante la primera parte de la meiosis (meiosis I) dando lugar a la formación de espermatocitos secundarios los cuales rápidamente completan la segunda parte de la meiosis (meiosis II) generando espermátides con número haploide de cromosomas. La *tercera fase de la espermatogénesis, fase de diferenciación ó espermiogénesis*, es una etapa en la cual ya no se producen divisiones celulares, sin embargo en esta etapa una espermátide esférica indiferenciada sufre una serie de transformaciones que concluirán con la formación de un espermatozoide altamente diferenciado con la capacidad de moverse en el tracto genital femenino y fecundar al oocito (Hess y de Franca 2008). La diferenciación consiste en cuatro fases o etapas: la fase del Golgi, la fase de capuchón, la fase acrosómica y la fase de maduración.

Fase de Golgi: la espermátide recientemente formada tiene una forma esférica con un aparato de Golgi muy desarrollado, el cual dará origen al acrosoma. Dentro del aparato de Golgi se forman pequeños gránulos proacrosómicos (material enzimático), dentro de una vesícula acrosómica. Estos gránulos comienzan a fusionarse en una única vesícula acrosómica, la cual se adhiere a la cara externa de la membrana nuclear. El lugar de esta adherencia señala el futuro extremo anterior del núcleo del espermatozoide. Los centriólos migran hacia el polo opuesto del núcleo, dando origen al axonema (centriolo distal) y a su anclaje nuclear (centriolo proximal).

Fase de capuchón: la membrana de la vesícula acrosómica va aumentando su superficie de contacto con la envoltura nuclear llegando a cubrir 1/3 de la superficie nuclear, formando como un capuchón. El gránulo acrosómico permanece en el polo del núcleo. El axonema comienza a sobresalir de la espermátide.

Fase acrosómica: el acrosoma continúa estirándose hasta cubrir los 2/3 del núcleo. El núcleo comienza a condensar su cromatina formando gránulos y a elongarse cambiando la forma de la espermátide. Los microtúbulos se ubican en la mitad caudal del núcleo formando una estructura denominada machete. Se forma el cuello, a partir del centriolo proximal y el annulus, límite entre la pieza intermedia y la principal de cola. Las espermátides se

encuentran fuertemente arraigadas a las células de Sertoli con sus colas protruyendo hacia la luz del túbulo.

Fase de maduración: las mitocondrias migran y se anclan alrededor del flagelo formando una espiral, definiendo la pieza intermedia. El capuchón postnuclear se forma a partir de los microtúbulos del machete. El annulus forma el límite entre la pieza intermedia y la principal. Se termina de condensar la cromatina nuclear adquiriendo la forma característica de cada especie. Las fallas en la condensación del núcleo aparecen como áreas claras, visibles con el microscopio de luz en forma de vacuolas nucleares. Como cualquier célula del cuerpo el espermatozoide está rodeado por membrana plasmática, cuya integridad es importante para la sobrevivencia y funcionalidad del espermatozoide.

Una vez finalizada la diferenciación, los espermatozoides recientemente formados son liberados por la célula de Sertoli, proceso que se denomina espermiación (Fawcett 1987, Senger 2003, Hess y de Franca 2008).

A excepción de las células más indiferenciadas, es decir las espermatogonias A_0 , el resto de las células germinales presentan citocinesis incompleta, es decir las células hijas se encuentran unidas mediante puentes citoplasmáticos. De esta forma grupos de espermatogonias, espermatocitos, o espermatides están conectados por puentes celulares, de forma que cada uno de los grupos celulares comparte el citoplasma. El número exacto de células germinales interconectadas por puentes celulares podrían ser alrededor de 50, se cree que estos puentes contribuirían a sincronizar el desarrollo de ese grupo celular. Este sincitio celular se rompe en cuanto las espermatides maduras son liberadas por las células de Sertoli (Senger 2003, Hess y de Franca 2008).

Morfología y estructura espermática

Los espermatozoides de mamíferos pueden dividirse en general en dos sub-unidades primarias: la cabeza y la cola, ambas rodeadas por la membrana plasmática. Las organelas principales de la cabeza son el núcleo y el acrosoma, que cubre las 2/3 partes del núcleo y se ubica en el ápice del mismo. La unión entre la cabeza y cola se realiza a través del cuello. La cola, puede dividirse a su vez en tres segmentos: la porción o pieza intermedia, la porción principal y la porción terminal. (Foto 3). Los espermatozoides de los mamíferos varían en tamaño dependiendo de la especie, en la tabla 1 se muestran algunos ejemplos.

Especie	Cabeza	Pieza intermedia	Largo Total
Bos taurus	6,8	9,8	53,5
Capra ibex	8,5	20	70
Canis familiaris	5,6	-	55,3
Equus caballus	7,0	9,8	60,6
Felis catus	4,8	8,3	59,3
Homo sapiens	6,1	4,7	58,4
Ovis aries	8,2	14	65
Sus scrofa	8,5	10	54,6

Cabeza: su forma es característica de cada especie. El *acrosoma* también varía con la especie, es muy pequeño en gatos y caballos. Posterior al acrosoma existe un segmento bien definido denominado segmento ecuatorial por la forma de luna que posee en el toro y en el conejo. El acrosoma posee varias enzimas hidrolíticas como hialuronidasas, proacrosina, acrosina, esterasas, neuraminidasas, fosfatasas ácidas, proteinasas ácidas, colagenasas, entre otras. Durante la fertilización, estas enzimas son liberadas gracias a la reacción acrosómica. En este momento se producen puntos de fusión entre la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática creándose así poros por donde el contenido enzimático escapa. La reacción enzimática inicial aparentemente se produciría en el borde anterior del segmento ecuatorial antes que en el ápice del acrosoma. El *núcleo* se caracteriza por una condensación muy alta de cromatina y tiene una forma característica de acuerdo a la constitución genética de la especie. La cromatina está compuesta por ADN altamente comprimido mediante puentes cisteína-protamina. Este ADN altamente compactado se mantiene inactivo hasta que las protaminas son desplazadas horas después de que el espermatozoide ingresa al oocito (Bedford y Hoskins 1990). El cuello, comprende la unión de la cola con la cabeza del espermatozoide, la cual se realiza entre el plato basal que ocupa la fosa de implantación y el capitulum que forma la porción anterior de la pieza de conexión de la cola, a partir del cual se extienden 9 columnas densas segmentadas, de 1-1,5 μm de largo, que se prolongan caudalmente con las 9 fibrillas densas del flagelo. El centríolo proximal persiste en el espermatozoide maduro y se ubica en forma transversal, inmediatamente por debajo de la superficie articular del capitel, quedando incluido en las 9 columnas; mientras que el centríolo

distal generalmente desaparece en la formación de la pieza de conexión (Fawcett y Phillips 1969, Bedford y Hoskins 1990).

La primera porción de la **cola** es la *pieza intermedia*. Ésta está formada por el axonema constituido por nueve microtúbulos dobles organizados en un círculo rodeando a un par central y por 9 fibras densas externamente a ellos. El axonema oficia de motor para los movimientos de la cola del espermatozoide, mientras que las fibras densas, le otorgan firmeza. La porción intermedia se caracteriza por poseer una vaina de mitocondrias organizadas helicoidalmente alrededor de las fibras densas. La longitud de esta vaina mitocondrial depende de la especie y terminan en el annulus, definiendo el comienzo de la pieza principal. La *pieza principal* se caracteriza por la presencia de una vaina fibrosa integrada por dos columnas continuas unidas entre sí por las llamadas “costillas”, dispuestas circunferencialmente. Las fibras densas que se encontraban en la pieza intermedia se continúan en esta porción, excepto dos. Estas fibras densas van adelgazándose progresivamente hacia distal. En la *porción terminal* de la cola, desaparecen la vaina fibrosa y las fibras densas, quedando constituida solamente por el axonema con los dobletes de microtúbulos desordenados rodeados por la membrana plasmática (Bedford y Hoskins 1990).

Ciclo del epitelio seminífero

Así como se mencionó anteriormente, las espermatogonias se sitúan en la base del túbulo seminífero y a medida que van diferenciándose se ubican en niveles más altos acercándose a la luz del túbulo. Las células que conforman el epitelio seminífero no están distribuidas al azar, sino que forman combinaciones o asociaciones celulares propias de cada especie. En los felinos y equinos se han identificado 8 asociaciones celulares, mientras que en el ratón se han identificado 12 asociaciones celulares, en la rata 14 y en humanos 6 (Johnson y col. 2000, Franca y Godinho 2003, Hess y de Franca 2008). La asociación particular dada entre espermatogonias, espermatocitos y espermátides a lo largo del túbulo seminífero varía con el tiempo y pasa sucesivamente por las ocho asociaciones para luego repetirse la serie. El **ciclo del epitelio seminífero** se define como “la serie de cambios que tienen lugar en un área determinada del epitelio seminífero entre dos apariciones de la misma asociación celular”(Leblond y Clermont 1952).

El tiempo requerido entre estas dos apariciones es la **duración del ciclo del epitelio seminífero** y es única para cada especie (Senger 2003, Hess y de Franca 2008). La duración del ciclo del epitelio seminífero en el gato es de 10,4 días, y considerando que son necesarios 4,5 ciclos para completar el proceso espermatogénico, la duración de la espermatogénesis en el gato es de 46,8 días. Es decir que una espermatogonia necesita 46,8 días (4,5 ciclos de 10,4 días cada uno) para completar su diferenciación y ser liberada en forma de espermatozoide

maduro hacia el epidídimo (Franca y Godinho 2003). En el bovino, en cambio la espermatogénesis dura 61 días (4,5 ciclos del epitelio seminífero de 13,5 días cada uno) (Senger 2003). En los caninos, la duración del ciclo espermatogénico es de $13,6 \pm 0,7$ días y son necesarios 4,5 ciclos espermatogénicos para completar la espermatogénesis, por lo que la espermatogénesis dura 62 días (Johnston y col. 2001).

Bibliografía

- Bedford, J. M. y Hoskins, D. D. (1990). "The mammalian spermatozoon: morphology, biochemistry and physiology". En *Marshall's physiology of reproduction*. (pp. 379-568). Edinburgh: Churchill-Livingstone.
- Benton, L.; Shan, L. X. y Hardy, M. P. (1995). "Differentiation of adult Leydig cells." *J Steroid Biochem Mol Biol* 53 (1-6), pp. 61-68.
- Blanco-Rodriguez, J. (2002). "DNA replication and germ cell apoptosis during spermatogenesis in the cat." *J Androl* 23 (4), pp. 484-490.
- Bustos-Obregon, E. (1976). "Ultrastructure and function of the lamina propria of mammalian seminiferous tubules." *Andrologia* 8 (3), pp. 179-185.
- Chen, H.; Ge, R. S. y Zirkin, B. R. (2009). "Leydig cells: From stem cells to aging." *Mol Cell Endocrinol* 306 (1-2), pp. 9-16.
- Fawcett, D. W. (1987). *Tratado de Histología*. (Herranz Rodriguez, G.). (11^o). Madrid: Interamericana McGraw-Hill.
- Fawcett, D. W. y Phillips, D. M. (1969). "The fine structure and development of the neck region of the mammalian spermatozoon." *Anat Rec* 165 (2), pp. 153-164.
- Franca, L. R. y Godinho, C. L. (2003). "Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*)." *Biol Reprod* 68 (5), pp. 1554-1561.
- Griswold, M. D. (1998). "The central role of Sertoli cells in spermatogenesis." *Semin Cell Dev Biol* 9 (4), pp. 411-416.
- Habert, R.; Lejeune, H. y Saez, J. M. (2001). "Origin, differentiation and regulation of fetal and adult Leydig cells." *Mol Cell Endocrinol* 179 (1-2), pp. 47-74.
- Haider, S. G. (2004). "Cell biology of Leydig cells in the testis." *Int Rev Cytol* 233 181-241.
- Hess, R. y de Franca, L. (2008). "Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium". En *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*. (pp. 1-15). Texas, USA.: Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, LLC.
- Johnson, L.; Thompson, D. L., Jr. y Varner, D. D. (2008). "Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis." *Anim Reprod Sci* 105 (1-2), pp. 23-51.
- Johnson, L.; Varner, D. D.; Roberts, M. E.; Smith, T. L.; Keillor, G. E. y Scrutchfield, W. L. (2000). "Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach." *Anim Reprod Sci* 60-61 471-480.
- Johnston, S. D.; Root Kustritz, M. y Olson, P. (2001). *Canine and Feline Theriogenology*. (1st.). Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- Kirkpatrick, J. (1985). "Seasonal testosterone levels, testosterone clearance, and testicular weights in male domestic cats." *Canadian Journal of Zoology*. 63 (6), pp. 1285-1287.

- Leblond, C. P. y Clermont, Y. (1952). "Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat." *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 55 548-573.
- Mendis-Handagama, S. M. y Ariyaratne, H. B. (2001). "Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis." *Biol Reprod* 65 (3), pp. 660-671.
- Núñez Favre, R. (2013). *Efecto del fotoperiodo y de la administración de melatonina sobre la producción espermática en el gato doméstico (Felis silvestris catus)*. Doctor en Ciencias Veterinarias, Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. pp. 78.
- Praderio, R.; Bonaura, M. C.; Núñez Favre, R. y Stornelli, M. A. (2012). "Estacionalidad reproductiva en el gato doméstico". En Morfológicas, S. A. d. C. *XIV Congreso de Ciencias Morfológicas Argentina*:
- Senger, P. L. (2003). *Pathways to Pregnancy and Parturition*. (Second Edition). Washington: Current Conceptions, Inc.

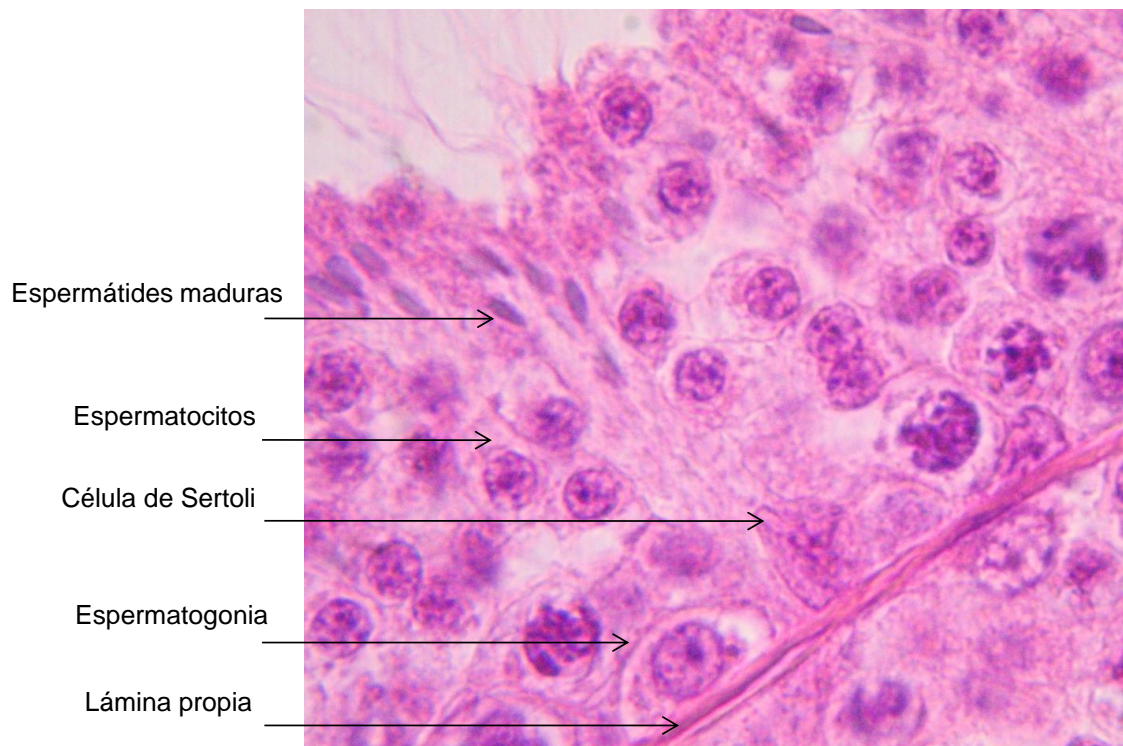


Foto 1: Fotomicrografía de parte de un túbulo seminífero de gato adulto en la cual puede observarse la organización del epitelio seminífero (40x).

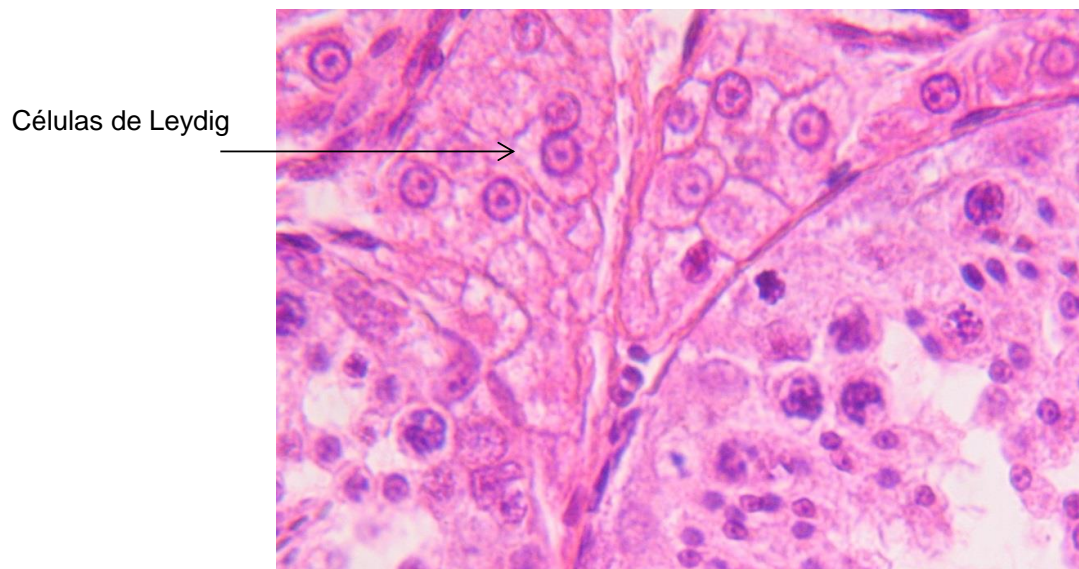


Foto 2: Fotomicrografía que muestra el tejido intersticial testicular de un gato adulto donde puede observarse gran cantidad de células de Leydig (40x).

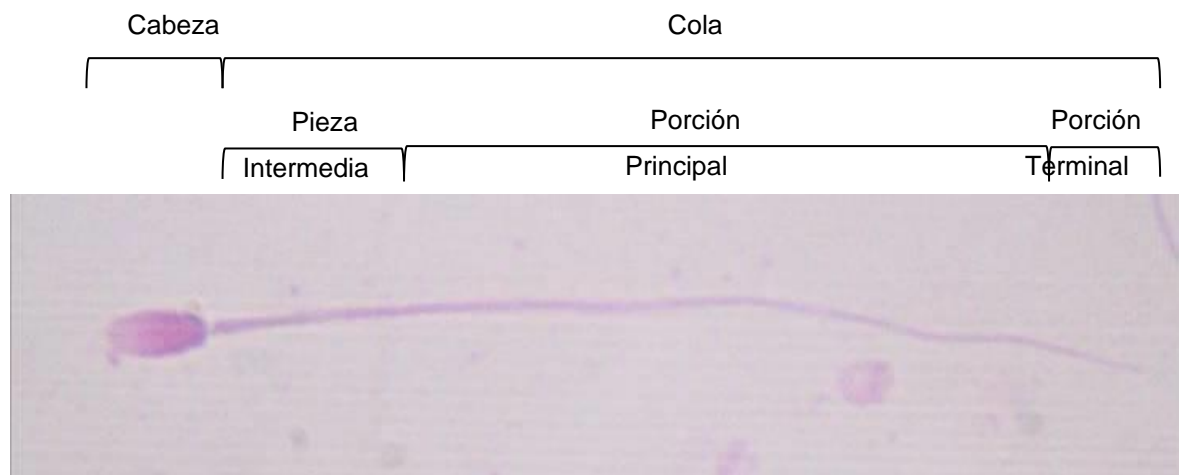


Foto 3: Fotomicrografía de un espermatozoide felino con morfología normal para mostrar las partes del mismo (100x).

CAPÍTULO 8

Estacionalidad reproductiva en el gato doméstico

Romina Nuñez Favre

Influencia del medio ambiente y regulación endocrina

A través de años de evolución, los mamíferos se han adaptado a vivir en diferentes hábitats. Estos hábitats están sometidos a fluctuaciones climáticas y variaciones en la cantidad de horas de luz diaria, las cuales son más pronunciadas a medida que aumenta la latitud, afectando la disponibilidad de alimentos. Los mamíferos que habitan regiones con diferencias marcadas en la cantidad de horas luz diarias a lo largo del año se adaptaron a estos cambios exhibiendo cambios cíclicos en su fisiología y comportamiento. De esta forma, el cambio adaptativo principal resulta en restringir la actividad reproductiva al momento del año en el cual es posible cubrir las demandas energéticas más altas (fines de la gestación, parto, lactancia y destete). Es así que la etapa reproductiva es coincidente con la mayor disponibilidad de alimento para asegurar la sobrevivencia de la cría. En zonas templadas, las mencionadas condiciones medioambientales ocurren en primavera y principios de verano. En tanto, en regiones tropicales y áridas estas condiciones están asociadas principalmente a la temporada de lluvias (Bronson 1989, Malpoux 2006). Por otra parte, en algunas especies se ha documentado la existencia de

un factor social, dado por estímulos táctiles, señales visuales, auditivas y olfativas que, a través de feromonas, influyen sobre el estado reproductivo en ovinos, bovinos, roedores y cerdos (Vandenbergh 1976, Kirkwood y col. 1981, O'Callaghan y col. 1994, Rekwot y col. 2001).

La manera en la que cada animal interactúa con estos factores depende, de la especie, de su genética individual y de su estado reproductivo en ese momento específico. La influencia de los factores ambientales sobre la regulación de la actividad sexual de mamíferos ha sido ampliamente estudiada. Actualmente se sabe que la estacionalidad reproductiva en especies que habitan zonas templadas, está regida por el fotoperiodo, es decir por la variación en la cantidad de horas luz diarias a través del año. La variación en la duración del día es uno de los factores más importantes en la regulación de la estacionalidad reproductiva debido a que se mantiene constante de un año a otro, siendo así altamente previsible, a diferencia de otros factores climáticos como la temperatura y las lluvias que presentan mayores variaciones anuales (Thiery y col. 2002). De esta forma, los animales presentan períodos de actividad sexual seguidos por períodos de reposo, de duración e intensidad variable regulados ambos por el fotoperiodo (Malpaux y col. 1996).

La manera en la que los animales sincronizan la actividad reproductiva en un momento específico del año comienza a estudiarse a principios de siglo. Las primeras comunicaciones de sustancias endocrinas neurales que regulan la actividad reproductiva datan de la década del 40 y fueron realizadas en ratas domésticas. A partir de ese momento el estudio sobre este tópico se extendió a otras especies y esta subdisciplina se transformó en especialización, la endocrinología reproductiva que, en un principio fue orientada hacia patrones bioquímicos y luego moleculares (Bronson 1989).

Actualmente el conocimiento en este área es inmenso y detallado. Es así, que se ha comprobado que el mecanismo por el cual el fotoperiodo regula la actividad reproductiva en animales de zonas templadas se encuentra relacionado estrechamente con la actividad de la glándula pineal y de su producto de secreción, la hormona melatonina. De esta forma la duración del día es captada a nivel ocular y transformada al ciclo diario de secreción de melatonina por la glándula pineal. La secreción nocturna de esta hormona refleja la duración de la noche, regulando así la secreción pulsátil de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) desde el hipotálamo. Así mismo las variaciones en la secreción de GnRH inducen variaciones en la secreción de hormona luteinizante (LH) responsable de la presencia o ausencia de ovulación en la hembra, y de variaciones en la producción espermática en el macho (Malpaux y col. 1999). Debido a que la melatonina no se almacena en la glándula pineal, la concentración sérica refleja fielmente su síntesis y liberación las cuales a su vez, están fuertemente ligadas al ciclo luz/oscuridad (Malpaux y col. 1997). Un cambio en la duración del tiempo de liberación de melatonina durante la noche, relacionado con la estación del año, estimula o frena el pulso de GnRH, la cual activa o suprime la liberación de LH y hormona folículo estimulante (FSH) hipofisarias, según la especie sea fotoperiódica positiva o negativa (Leyva y col. 1989, Vieyetz 1995, Malpaux y col. 1999, Claustrat y col. 2005). La estimulación o inhibición en la liberación

de gonadotrofinas está además, regulada por un mecanismo de retroalimentación negativo con sus productos finales de secreción (inhibina y testosterona).

Estacionalidad en la hembra felina

Así como sucede en otras especies domésticas y silvestres, los felinos domésticos (*Felis silvestris catus*) que habitan zonas templadas, también evidencian estacionalidad reproductiva. Desde hace más de 3 décadas la gata ha sido clasificada como fotoperiódica positiva. Manifestando ciclos estrales durante los días largos de primavera-verano (alrededor de 12 horas luz diaria), en concordancia con bajas concentraciones séricas de melatonina. Durante la temporada reproductiva los celos se manifiestan de forma ininterrumpida cada 14 a 19 días de no mediar gestación, pseudopreñez o enfermedad (Johnston y col. 2001). Por el contrario, durante el invierno, cuando los días poseen menos de 8 horas luz, la concentración sérica de melatonina aumenta, no se producen pulsos de GnRH y el eje hipofisario-gonadal está quiescente por lo que la actividad ovárica cesa y la hembra entra en anestro (Leyva y col. 1984). En esta especie, las concentraciones plasmáticas de melatonina están sincronizadas con las concentraciones plasmáticas de prolactina. Por lo que ambas hormonas se encuentran elevadas durante el fotoperiodo corto (estación no reproductiva) y bajas durante el fotoperiodo largo (estación reproductiva (Leyva y col. 1984, Verstegen 1998).

Estacionalidad en el macho felino

Si bien la estacionalidad reproductiva se encuentra claramente definida en la hembra felina desde hace décadas, hace solo pocos años que algunos investigadores sugirieron la influencia del fotoperiodo sobre la fisiología reproductiva de los machos. A fines de la década de los noventa, algunos autores comunicaron la ausencia de estacionalidad reproductiva en el gato (Spindler y Wildt 1999). Sin embargo, estudios posteriores sugirieron una producción espermática estacional en machos felinos (Axner y Linde Forsberg 2007, Blottner y Jewgenow 2007, Stornelli 2007).

Así como ocurre en otras especies fotoperiódicas, los felinos domésticos presentan espermatogénesis continua mostrando solo variaciones en los parámetros seminales a lo largo del año, siendo éste el principal efecto del fotoperiodo. Ya en la década del 80, Johnstone (1984) observó un aumento en el volumen seminal en eyaculados realizados durante la temporada reproductiva de la hembra. Veinte años más tarde, la estacionalidad reproductiva en el gato doméstico fue sugerida por algunos autores quienes comunicaron que la cantidad y

calidad de espermatozoides epididimales fue significativamente mayor en muestras provenientes de epidídimos de gatos castrados en días de más de 11 horas luz (Stornelli y col. 2004, Tittarelli y col. 2004). Dos años más tarde, Reyna y col. (2006) mostraron la ocurrencia de variaciones en la cantidad de espermatozoides testiculares en relación a la época del año, encontrando mayores valores de concentración espermática en muestras provenientes de animales orquiectomizados en primavera en comparación con invierno. En concordancia con estos resultados, Blottner (2007) observó que si bien en todas las estaciones se mantiene la capacidad de producir semen, existieron variaciones en el peso testicular y en la cantidad de espermatozoides por testículo en muestras de animales castrados durante la primavera comparado con los estudiados en otoño-invierno. En este estudio también se encontraron diferencias en la motilidad y el porcentaje de espermatozoides normales en las mismas estaciones estudiadas. Así mismo, un estudio retrospectivo sobre morfología espermática realizado en Suecia, evidenció que el porcentaje de espermatozoides normales fue mayor en muestras seminales de gatos tomadas en ascenso lumínico (Axner y Linde Forsberg 2007). Similares resultados fueron hallados en Argentina, en donde también se evidenciaron variaciones estacionales en el desarrollo de la hilera seminal en gatos adultos castrados durante diferentes épocas del año, encontrándose un mayor desarrollo de la hilera seminal durante los meses con mayor cantidad de horas luz (Stornelli y col. 2009).

En la actualidad existe poca evidencia sobre la calidad seminal del gato doméstico y cuáles serían los parámetros seminales esperables durante la época reproductiva de la hembra. Es así que, aún no se han definido los parámetros seminales del espermograma normal. Algunos autores han encontrado que la cantidad de espermatozoides morfológicamente normales en gatos mestizos sería de alrededor del 40%, mientras que otros autores sugieren que el porcentaje sería mayor al 60% (Wildt y col. 1983, Howard y col. 1990, Axner y Linde Forsberg 2007). La dificultad para estandarizar los valores del espermograma normal, surge de la gran variabilidad existente entre diferentes gatos y entre muestras del mismo gato cuando se utiliza electroeyaculación (Pineda y col. 1984, Zambelli y Cunto 2006). Así como también, debe tenerse en cuenta que, la técnica mediante la cual se realiza la extracción de semen (vagina artificial, electroeyaculación o cateterización uretral), las variaciones estacionales durante el año y las diferentes técnicas utilizadas para la evaluación seminal en los diferentes laboratorios (en cuanto a tinciones, metodología de evaluación, etc.) han hecho que fuera complejo establecer los parámetros que debe tener un semen normal de buena calidad en esta especie (Axner y Linde Forsberg 2007).

Este hecho adquiere gran importancia al estimar los parámetros seminales normales para cada animal en particular, habiendo sido sugeridas al menos 5 evaluaciones repetidas en el tiempo para evaluar la fertilidad de un gato (Johnstone 1984).

Un estudio reciente realizado mediante la recuperación espermática epididimal de 43 gatos castrados en las últimas dos semanas de cada estación del año, ha mostrado que los animales orquiectomizados en épocas con días en ascenso lumínico (invierno-primavera) presentaron un

porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales y de membrana plasmática íntegra significativamente superior a los gatos orquiectomizados en descenso lumínico (verano-otoño; $45,95 \pm 2,5$ vs. $35,95 \pm 3,4$ $P < 0,02$; $69,07 \pm 2,7$ vs. $60,66 \pm 2,1$ $P < 0,01$ respectivamente). En concordancia, los animales castrados en ascenso lumínico mostraron una tendencia a tener un mayor porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva y una mayor cantidad de espermatozoides totales comparados con aquellos castrados en descenso lumínico ($56,30 \pm 2,8$ vs. $47,33 \pm 3,7$ $P < 0,06$; $13,89 \pm 1,4$ vs. $10,04 \pm 1,8$ $P < 0,09$) (Nuñez Favre y col. 2012a).

Las variaciones observadas en la calidad de los espermatozoides recuperados a través del año mostraron acompañar cambios histológicos testiculares. Si bien en todas las estaciones se evidenciaron túbulos seminíferos con diferentes grados de maduración, los animales castrados durante ascenso lumínico mostraron una mayor proporción de túbulos con espermátides maduras en comparación con los animales castrados en días con descenso lumínico. De manera inversa, en épocas con descenso lumínico se encontró una mayor proporción de túbulos con espermátides inmaduras. Así mismo, los animales castrados durante ascenso lumínico presentaron una mayor cantidad de células de Sertoli por túbulo y de células intersticiales de Leydig por campo, en comparación con los animales castrados en descenso lumínico (Stornelli y col. 2009). No obstante la concentración de testosterona sérica mantuvo valores similares en los periodos evaluados (ascenso vs. descenso lumínico; $0,76 \pm 0,15$ vs. $0,59 \pm 0,19$ ng/dl; $P > 0,51$; (Nuñez Favre y col. 2012a). Así mismo y en concordancia con lo previamente descrito por otros autores, se encontró gran variabilidad individual en la concentración sérica de esta hormona entre los animales muestreados (Tsutsui y col. 1990, Blottner y Jewgenow 2007, Tsutsui y col. 2009).

En el gato doméstico se ha demostrado que la producción diaria de espermatozoides por gramo de testículo es de 16 millones y el peso promedio de cada testículo es de 1,2 gramos. La duración de la espermatogénesis es de 47 días, esto significa que cada 47 días los espermatozoides de la misma generación son eliminados hacia el epidídimo (Franca y Godinho 2003). En el epidídimo se produce la maduración espermática, mediante la cual los espermatozoides se capacitan para penetrar la zona pelúcida y fecundar al oocito. Así como también los espermatozoides listos para ser eyaculados se almacenan en la cola del epidídimo. Durante el pasaje por el epidídimo, la mayor parte del fluido testicular, rico en Na-Cl es reabsorbido e intercambiado por K con el fin de deshidratar y estabilizar la membrana del espermatozoide, ya que las altas concentraciones de Na promueven la capacitación y la reacción acrosómica. Las células epididimales también producen y secretan fosfatasa alcalina. Ésta puede utilizarse para diferenciar entre un eyaculado incompleto, conteniendo solo fluido proveniente de las glándulas accesorias, de un eyaculado completo, conteniendo además fluido epididimal (Axner 2006). Este órgano presenta un epitelio pseudoestratificado en el cual pueden observarse tres tipos celulares (células principales, apicales y basales). En el gato doméstico, las células principales se dividen en células claras y oscuras. Esta característica tintorial observada al microscopio óptico podría relacionarse con diferencias en la fisiología de

cada tipo celular. En invierno, se ha evidenciado una menor proporción de células oscuras y mayor de células claras, mientras que la situación inversa se observó durante los días de verano-otoño. Este hecho podría sugerir una mayor actividad celular epididimal, relacionada con la producción de factores implicados en la maduración espermática, en la etapa de mayor producción de espermatozoides (Reyna y col. 2008). Así mismo, se ha evidenciado que animales castrados durante los meses de primavera y verano presentaron un mayor porcentaje de células PAS positivas. Este hallazgo se correlacionaría con una mayor actividad secretora del epidídimo en concordancia con la época de mayor producción espermática en el gato doméstico. Mostrando una mayor producción de mucopolisacáridos en la estación del año con días más largos (Savignone y col. 2007).

Bibliografía

- Axner, E. (2006). "Sperm maturation in the domestic cat." *Theriogenology* 66 (1), pp. 14-24.
- Axner, E. y Linde Forsberg, C. (2007). "Sperm morphology in the domestic cat, and its relation with fertility: a retrospective study." *Reprod Domest Anim* 42 (3), pp. 282-291.
- Blottner, S. y Jewgenow, K. (2007). "Moderate seasonality in testis function of domestic cat." *Reprod Domest Anim* 42 (5), pp. 536-540.
- Bronson, F. (1989). *Mammalian Reproductive Biology*. Chicago: The University of Chicago Press.
- Claustrat, B.; Brun, J. y Chazot, G. (2005). "The basic physiology and pathophysiology of melatonin." *Sleep Med Rev* 9 (1), pp. 11-24.
- Chemineau, P.; Malpoux, B.; Delgadillo, J. A.; Guérin, Y.; Ravault, J. P.; Thimonier, J. y Pelletier, J. (1992). "Control of sheep and goat reproduction: use of light and melatonin." *Anim Reprod Sci* (30), pp. 157-184.
- da Silva, T. F.; da Silva, L. D.; Uchoa, D. C.; Monteiro, C. L. y de Aguiar Thomaz, L. (2006). "Sexual characteristics of domestic queens kept in a natural equatorial photoperiod." *Theriogenology* 66 (6-7), pp. 1476-1481.
- Delgadillo, J. A.; Leboeuf, B. y Chemineau, P. (1993). "Maintenance of sperm production in bucks during a third year of short photoperiodic cycles." *Reprod Nutr Dev* 33 (6), pp. 609-617.
- Forsberg, M.; Fougner, J. A.; Hofmo, P. O.; Madej, M. y Einarsson, E. J. (1989). "Photoperiodic regulation of reproduction in the male silver fox (*Vulpes vulpes*)." *J Reprod Fertil* 87 (1), pp. 115-123.
- Franca, L. R. y Godinho, C. L. (2003). "Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*)." *Biol Reprod* 68 (5), pp. 1554-1561.
- Howard, J. G.; Brown, J. L.; Bush, M. y Wildt, D. E. (1990). "Teratospermic and normospermic domestic cats: ejaculate traits, pituitary-gonadal hormones, and improvement of spermatozoal motility and morphology after swim-up processing." *J Androl* 11 (3), pp. 204-215.
- Johnston, S. D.; Root Kustritz, M. y Olson, P. (2001). *Canine and Feline Theriogenology*. (1st.). Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- Johnstone, I. (1984). "Electroejaculation in the domestic cat." *Aust Vet J* 61 (5), pp. 155-158.
- Kirkwood, R. N.; Forbes, J. M. y Hughes, P. E. (1981). "Influence of boar contact on attainment of puberty in gilts after removal of the olfactory bulbs." *J Reprod Fertil* 61 (1), pp. 193-196.
- Legan, S. J. y Karsch, F. J. (1980). "Photoperiodic control of seasonal breeding in ewes: modulation of the negative feedback action of estradiol." *Biol Reprod* 23 (5), pp. 1061-1068.

- Leyva, H.; Addiego, L. y Stabenfeldt, G. (1984). "The effect of different photoperiods on plasma concentrations of melatonin, prolactin, and cortisol in the domestic cat." *Endocrinology* 115 (5), pp. 1729-1736.
- Leyva, H.; Madley, T. y Stabenfeldt, G. H. (1989). "Effect of light manipulation on ovarian activity and melatonin and prolactin secretion in the domestic cat." *J Reprod Fertil Suppl* 39 125-133.
- Malpaux, B. (2006). "Seasonal Regulation of Reproduction in Mammals". En *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. (pp. 2231-2282). USA: Elsevier Inc.
- Malpaux, B.; Thiery, J. C. y Chemineau, P. (1999). "Melatonin and the seasonal control of reproduction." *Reprod Nutr Dev* 39 (3), pp. 355-366.
- Malpaux, B.; Viguie, C.; Skinner, D. C.; Thiery, J. C. y Chemineau, P. (1997). "Control of the circannual rhythm of reproduction by melatonin in the ewe." *Brain Res Bull* 44 (4), pp. 431-438.
- Malpaux, B.; Viguie, C.; Thiery, J. y Chemineau, P. (1996). "Controle photopériodique de la reproduction.". En *INRA Prod. Anim.* (9-23).
- Nagy, P.; Guillaume, D. y Daels, P. (2000). "Seasonality in mares." *Anim Reprod Sci* 60-61 245-262.
- Núñez Favre, R.; Bonaura, M.; Tittarelli, C.; Mansilla-Hermann, D.; de la Sota, R. y Stornelli, M. (2012a). "Effect of Natural Photoperiod on Epididymal Sperm Quality and Testosterone Serum Concentration in Domestic Cat (*Felis silvestris catus*).". *Reprod Domest Anim* 47 Suppl 6 232-234.
- O'Callaghan, D.; Donovan, A.; Sunderland, S. J.; Boland, M. P. y Roche, J. F. (1994). "Effect of the presence of male and female flockmates on reproductive activity in ewes." *J Reprod Fertil* 100 (2), pp. 497-503.
- Pineda, M. H.; Dooley, M. P. y Martin, P. A. (1984). "Long-term study on the effects of electroejaculation on seminal characteristics of the domestic cat." *Am J Vet Res* 45 (5), pp. 1038-1041.
- Rekwot, P. I.; Ogwu, D.; Oyedipe, E. O. y Sekoni, V. O. (2001). "The role of pheromones and biostimulation in animal reproduction." *Anim Reprod Sci* 65 (3-4), pp. 157-170.
- Reyna, J. C.; Núñez Favre, R.; Savignone, C. A.; Tittarelli, C. M.; Stornelli, M. C.; Guzzetti, J.; García Mitacek, M. C. y Stornelli, M. A. (2008). "Influencia del fotoperiodo sobre la cantidad de células claras y oscuras en el gato doméstico.". En *IX Jornadas de divulgación técnico-científicas* (198-199). Santa Fe:
- Savignone, C. A.; Reyna, J. C.; Stornelli, M. C.; Tittarelli, C. M.; Núñez Favre, R.; García Mitacek, M. C.; de la Sota, R. L. y Stornelli, M. A. (2007). "Presencia de mucopolisacáridos en el epitelio epididimal del gato doméstico en diferentes épocas del año.". En *XXIV Jornadas Científicas de la Asociación de Biología de Tucumán*. (165).
- Smith, A.; Bugge, H. P.; Berg, K. A.; Moller, O. y Hansson, V. (1986). "Seasonal changes in testicular structure and function in the blue fox (*Alopex lagopus*), as quantified by

- morphometric analysis and measurement of adenylate cyclase activity." *Int J Androl* 9 (1), pp. 53-66.
- Smith, A. J.; Clausen, O. P.; Kirkhus, B.; Jahnsen, T.; Moller, O. M. y Hansson, V. (1984). "Seasonal changes in spermatogenesis in the blue fox (*Alopex lagopus*), quantified by DNA flow cytometry and measurement of soluble Mn²⁺-dependent adenylate cyclase activity." *J Reprod Fertil* 72 (2), pp. 453-461.
- Spindler, R. E. y Wildt, D. E. (1999). "Circannual variations in intraovarian oocyte but not epididymal sperm quality in the domestic Cat." *Biol Reprod* 61 (1), pp. 188-194.
- Stetson, M. H. y Tate-Ostroff, B. (1981). "Hormonal regulation of the annual reproductive cycle of golden hamsters." *Gen Comp Endocrinol* 45 (3), pp. 329-344.
- Stetson, M. H.; Watson-Whitmyre, M. y Matt, K. S. (1977). "Termination of photorefractoriness in golden hamsters-photoperiodic requirements." *J Exp Zool* 202 (1), pp. 81-88.
- Stetson, M. H.; Watson-Whitmyre, M. y Tate-Ostroff, B. (1983). "Role of the pineal and its hormone melatonin in the termination of photorefractoriness in golden hamsters." *Biol Reprod* 29 (3), pp. 689-696.
- Stornelli, M. A. (2007). "Basic and advanced evaluation of cat's semen." *Brazilian J. Anim. Reprod.* (31), pp. 135-140.
- Stornelli, M. A.; Reyna, J. C.; Stornelli, M. C.; Nunez Favre, R.; Savignone, C. A.; Tittarelli, C. M. y de la Sota, R. L. (2009). "Seasonal changes in testicular cell morphology in domestic male cats (*Felis catus*)." *Reprod Domest Anim* 44 Suppl 2 287-290.
- Stornelli, M. A.; Stornelli, M. C.; Savignone, C. A.; Tittarelli, C. M.; Reyna, J. C. y de la Sota, R. L. (2004). "Influencia del fotoperíodo en la cantidad de espermatozoides epididimales en gatos." En *I Congreso y IV Jornada Nacional de Felinos*. (19-20). Corrientes:
- Thiery, J. C.; Chemineau, P.; Hernandez, X.; Migaud, M. y Malpoux, B. (2002). "Neuroendocrine interactions and seasonality." *Domest Anim Endocrinol* 23 (1-2), pp. 87-100.
- Tittarelli, C. M.; Savignone, C. A.; Stornelli, M. A.; Stornelli, M. C.; Desmarás, E. y de la Sota, R. L. (2004). "Concentración y viabilidad de espermatozoides epididimales felinos en diferentes épocas del año." En *VII Reunión Interamericana de Cátedras de Fisiología Animal*. (106). La Pampa:
- Tsutsui, T.; Murao, I.; Kawakami, E.; Ogasa, A. y Stabenfeldt, G. H. (1990). "Androgen concentration in the blood and spermatogenic function of tom cats during the breeding season." *Nippon Juigaku Zasshi* 52 (4), pp. 801-806.
- Tsutsui, T.; Onodera, F.; Oba, H.; Mizutani, T. y Hori, T. (2009). "Plasma hormone levels and semen quality in male cats during non-breeding and breeding seasons." *Reprod Domest Anim* 44 Suppl 2 291-293.
- Vandenbergh, J. G. (1976). "Acceleration of sexual maturation in female rats by male stimulation." *J Reprod Fertil* 46 (2), pp. 451-453.

- Verstegen, J. P. (1998). "Physiology and endocrinology of reproduction in female cats.". En *Small animal reproduction and neonatology*. (pp. 105-111). Cheltenham, United Kingdom.
- Vieytes, M. (1995). "La glándula pineal.". En *Fisiología veterinaria*. (pp. 696-706). Nueva York: Interamericana McGraw-Hill.
- Wildt, D. E.; Bush, M.; Howard, J. G.; O'Brien, S. J.; Meltzer, D.; Van Dyk, A.; Ebedes, H. y Brand, D. J. (1983). "Unique seminal quality in the South African cheetah and a comparative evaluation in the domestic cat." *Biol Reprod* 29 (4), pp. 1019-1025.
- Zambelli, D. y Cunto, M. (2006). "Semen collection in cats: techniques and analysis." *Theriogenology* 66 (2), pp. 159-165.

CAPÍTULO 9

Refractariedad al estímulo lumínico

Romina Nuñez Favre

En algunas especies domésticas y silvestres, ya sean fotoperiodicas positivas o negativas, además de estacionalidad en la actividad reproductiva también se ha evidenciado un fenómeno de insensibilidad al estímulo lumínico constante denominado fotorrefractariedad (Stetson y col. 1977, Almeida y Lincoln 1984, Forsberg y col. 1989).

Fotorrefractariedad en especies fotoperiodicas negativas

El fenómeno fotorrefractario ha sido comunicado en el zorro azul (*Alopex lagopus*) y plateado (*Vulpes vulpes*), en estas especies los días cortos son necesarios para estimular el eje gonadal (Smith y col. 1984, Smith y col. 1986, Forsberg y col. 1989). Sin embargo, estos animales muestran regresión testicular luego de un periodo de aproximadamente 1 año de fotoperiodo corto estimulante, siendo la calidad seminal muy pobre y con mala capacidad fecundante pos-descongelado (Forsberg y col. 1989). En concordancia zorros sometidos a fotoperiodo natural de ascenso lumínico durante 4 meses mostraron un rápido desarrollo testicular al transferirlos a fotoperiodo artificial de días cortos, demostrando el efecto estimulatorio de los días cortos (Forsberg y col. 1989).

De manera semejante, Almeida mostró que carneros expuestos a días cortos durante 94 semanas veían estimulada su actividad testicular durante las primeras 16 semanas, a partir de la cual periodos de desarrollo e involución testicular fueron observados. Los cambios cíclicos en la actividad gonadal mostraron ser independientes del fotoperiodo al cual estaban expuestos los animales evidenciando fotorrefractoriedad. Estos cambios cíclicos en la actividad testicular se presentan como una adaptación al estímulo lumínico constante. Sin embargo la fotorrefractoriedad observada luego de 94 semanas de fotoperiodo de días cortos constante pudo ser revertida exponiendo a los animales a fotoperiodo de días largos durante 16 semanas evidenciando una rápida respuesta hormonal y testicular 3 semanas después de realizado el cambio fotoperiodico (Almeida y Lincoln 1984). Este fenómeno fotorrefractorio puede ser evitado exponiendo a los animales a periodos alternados de días largos y cortos. Este manejo es esencial para el control fotoperiodico de la actividad sexual en animales mantenidos en ambientes controlados (Almeida y Lincoln 1984, Chemineau y col. 1992). Al realizar cambios lumínicos cada 30 o 60 días, los animales responden siempre al fotoperiodo del ambiente, manteniéndose la actividad reproductiva (Legan y Karsch 1980, Delgadillo y col. 1993). Esta alternancia mensual entre días cortos y largos es usada en carneros y chivos en centros de inseminación artificial, para inhibir el efecto foto-refractorio obteniendo semen todo el año sin variaciones en la calidad espermática ni en la fertilidad. Mediante este manejo lumínico se ha logrado mantener la calidad seminal por 3 años consecutivos (Delgadillo y col. 1993).

Fotorrefractoriedad en especies fotoperiodicas positivas

Los roedores también han mostrado presentar este fenómeno fotorrefractorio. Es así que, el hámster dorado (*Mesocricetus auratus*), el cual presenta actividad reproductiva durante los días largos de primavera-verano, evidencia refractoriedad al estímulo lumínico constante. Esta refractoriedad se manifiesta en algunos animales 10 a 12 semanas después de comenzado el periodo inhibitorio de días cortos, evidenciándose reactivación gonadal espontánea con activación espermatogénica y de los ciclos estrales. Esta reactivación gonadal se produce incluso en ausencia total de luz y estos animales son denominados fotorrefractorios. Los animales fotorrefractorios, no solo no responden al estímulo lumínico inhibitor, sino que también son refractorios a la acción de melatonina exógena, posiblemente debido a insensibilidad de los tejidos blanco para esta hormona. Esta refractoriedad puede ser revertida exponiendo a los animales a un periodo de 11 semanas de días largos luego de los cuales, tanto los machos como las hembras, vuelven a ser sensibles nuevamente al fotoperiodo corto (Stetson y col. 1977, Stetson y Tate-Ostroff 1981, Stetson y col. 1983).

También en los equinos se ha evidenciado este fenómeno, se ha observado que yeguas mantenidas bajo fotoperiodo artificial constante de días largos o cortos, presentan una

reactivación de los ciclos independiente de la condición lumínica en la que se encuentran los animales (Nagy y col. 2000).

Como se mencionara anteriormente, las variaciones fotoperiodicas determinan la estación reproductiva en gatos domésticos que habitan zonas templadas. No obstante, esta estacionalidad no se observa en gatas que habitan en zonas ecuatoriales ni en gatas mantenidas bajo fotoperiodo largo artificial durante 6 meses (da Silva y col. 2006). Así mismo, nuestro grupo de trabajo ha observado que las gatas ciclan en forma continua durante más de un año si se las mantiene con 12 horas luz diaria sin presentar evidencia de refractariedad (Gimenez y col. datos no publicados). Sin embargo, el fenómeno fotorrefractario comunicado en otras especies fue descrito recientemente en gatos machos. Nuñez Favre y col. (2012) evidenciaron este fenómeno en gatos mantenidos durante 18 meses con fotoperiodo estimuladorio (12 horas Luz: 12 horas Oscuridad). En nuestro trabajo pudo observarse una disminución en la calidad seminal en todos los parámetros evaluados (motilidad, vigor, volumen, concentración espermática, cantidad de espermatozoides totales, porcentaje de espermatozoides vivos, porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática íntegra y porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales) manteniendo los animales una producción espermática basal. Estos animales fueron sometidos a fotoperiodo corto (8L-16O) durante 2 meses después de los cuales retornaron a fotoperiodo largo. Con este manejo lumínico todos los animales mostraron una significativa mejora de los parámetros seminales evaluados. De esta forma al igual que en otras especies estacionales la disminución en la calidad seminal inducida por un prolongado periodo estimuladorio pudo ser revertida por el cambio a días cortos. Esto indica que para mantener una buena calidad seminal en gatos es necesario realizar un manejo lumínico adecuado para inhibir el efecto fotorrefractario (Nuñez Favre y col. 2012b).

Bibliografía

- Almeida, O. F. y Lincoln, G. A. (1984). "Reproductive photorefractoriness in rams and accompanying changes in the patterns of melatonin and prolactin secretion." *Biol Reprod* 30 (1), pp. 143-158.
- Axner, E. (2006). "Sperm maturation in the domestic cat." *Theriogenology* 66 (1), pp. 14-24.
- Axner, E. y Linde Forsberg, C. (2007). "Sperm morphology in the domestic cat, and its relation with fertility: a retrospective study." *Reprod Domest Anim* 42 (3), pp. 282-291.
- Blottner, S. y Jewgenow, K. (2007). "Moderate seasonality in testis function of domestic cat." *Reprod Domest Anim* 42 (5), pp. 536-540.
- Bronson, F. (1989). *Mammalian Reproductive Biology*. Chicago: The University of Chicago Press.
- Claustrat, B.; Brun, J. y Chazot, G. (2005). "The basic physiology and pathophysiology of melatonin." *Sleep Med Rev* 9 (1), pp. 11-24.
- Chemineau, P.; Malpoux, B.; Delgadillo, J. A.; Guérin, Y.; Ravault, J. P.; Thimonier, J. y Pelletier, J. (1992). "Control of sheep and goat reproduction: use of light and melatonin." *Anim Reprod Sci* (30), pp. 157-184.
- da Silva, T. F.; da Silva, L. D.; Uchoa, D. C.; Monteiro, C. L. y de Aguiar Thomaz, L. (2006). "Sexual characteristics of domestic queens kept in a natural equatorial photoperiod." *Theriogenology* 66 (6-7), pp. 1476-1481.
- Delgadillo, J. A.; Leboeuf, B. y Chemineau, P. (1993). "Maintenance of sperm production in bucks during a third year of short photoperiodic cycles." *Reprod Nutr Dev* 33 (6), pp. 609-617.
- Forsberg, M.; Fougner, J. A.; Hofmo, P. O.; Madej, M. y Einarsson, E. J. (1989). "Photoperiodic regulation of reproduction in the male silver fox (*Vulpes vulpes*)." *J Reprod Fertil* 87 (1), pp. 115-123.
- Franca, L. R. y Godinho, C. L. (2003). "Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*)." *Biol Reprod* 68 (5), pp. 1554-1561.
- Howard, J. G.; Brown, J. L.; Bush, M. y Wildt, D. E. (1990). "Teratospermic and normospermic domestic cats: ejaculate traits, pituitary-gonadal hormones, and improvement of spermatozoal motility and morphology after swim-up processing." *J Androl* 11 (3), pp. 204-215.
- Johnston, S. D.; Root Kustritz, M. y Olson, P. (2001). *Canine and Feline Theriogenology*. (1st.). Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- Johnstone, I. (1984). "Electroejaculation in the domestic cat." *Aust Vet J* 61 (5), pp. 155-158.
- Kirkwood, R. N.; Forbes, J. M. y Hughes, P. E. (1981). "Influence of boar contact on attainment of puberty in gilts after removal of the olfactory bulbs." *J Reprod Fertil* 61 (1), pp. 193-196.

- Legan, S. J. y Karsch, F. J. (1980). "Photoperiodic control of seasonal breeding in ewes: modulation of the negative feedback action of estradiol." *Biol Reprod* 23 (5), pp. 1061-1068.
- Leyva, H.; Addiego, L. y Stabenfeldt, G. (1984). "The effect of different photoperiods on plasma concentrations of melatonin, prolactin, and cortisol in the domestic cat." *Endocrinology* 115 (5), pp. 1729-1736.
- Leyva, H.; Madley, T. y Stabenfeldt, G. H. (1989). "Effect of light manipulation on ovarian activity and melatonin and prolactin secretion in the domestic cat." *J Reprod Fertil Suppl* 39 125-133.
- Malpaux, B. (2006). "Seasonal Regulation of Reproduction in Mammals". En *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. (pp. 2231-2282). USA: Elsevier Inc.
- Malpaux, B.; Thiery, J. C. y Chemineau, P. (1999). "Melatonin and the seasonal control of reproduction." *Reprod Nutr Dev* 39 (3), pp. 355-366.
- Malpaux, B.; Viguie, C.; Skinner, D. C.; Thiery, J. C. y Chemineau, P. (1997). "Control of the circannual rhythm of reproduction by melatonin in the ewe." *Brain Res Bull* 44 (4), pp. 431-438.
- Malpaux, B.; Viguie, C.; Thiery, J. y Chemineau, P. (1996). "Controle photopériodique de la reproduction.". En *INRA Prod. Anim.* (9-23).
- Nagy, P.; Guillaume, D. y Daels, P. (2000). "Seasonality in mares." *Anim Reprod Sci* 60-61 245-262.
- Núñez Favre, R.; Bonaura, M.; Tittarelli, C.; Mansilla-Hermann, D.; de la Sota, R. y Stornelli, M. (2012a). "Effect of Natural Photoperiod on Epididymal Sperm Quality and Testosterone Serum Concentration in Domestic Cat (*Felis silvestris catus*).". *Reprod Domest Anim* 47 Suppl 6 232-234.
- Núñez Favre, R.; Bonaura, M.; Tittarelli, C.; Stornelli, M. y de la Sota, R. L. (2012b). "Effect of refractoriness to long photoperiod on sperm production and quality in tomcats." *Reprod Domest Anim* 47 Suppl 6 235-237.
- O'Callaghan, D.; Donovan, A.; Sunderland, S. J.; Boland, M. P. y Roche, J. F. (1994). "Effect of the presence of male and female flockmates on reproductive activity in ewes." *J Reprod Fertil* 100 (2), pp. 497-503.
- Pineda, M. H.; Dooley, M. P. y Martin, P. A. (1984). "Long-term study on the effects of electroejaculation on seminal characteristics of the domestic cat." *Am J Vet Res* 45 (5), pp. 1038-1041.
- Rekwot, P. I.; Ogwu, D.; Oyedipe, E. O. y Sekoni, V. O. (2001). "The role of pheromones and biostimulation in animal reproduction." *Anim Reprod Sci* 65 (3-4), pp. 157-170.
- Reyna, J. C.; Núñez Favre, R.; Savignone, C. A.; Tittarelli, C. M.; Stornelli, M. C.; Guzzetti, J.; García Mitacek, M. C. y Stornelli, M. A. (2008). "Influencia del fotoperiodo sobre la cantidad de células claras y oscuras en el gato doméstico.". En *IX Jornadas de divulgación técnico-científicas* (198-199). Santa Fe:

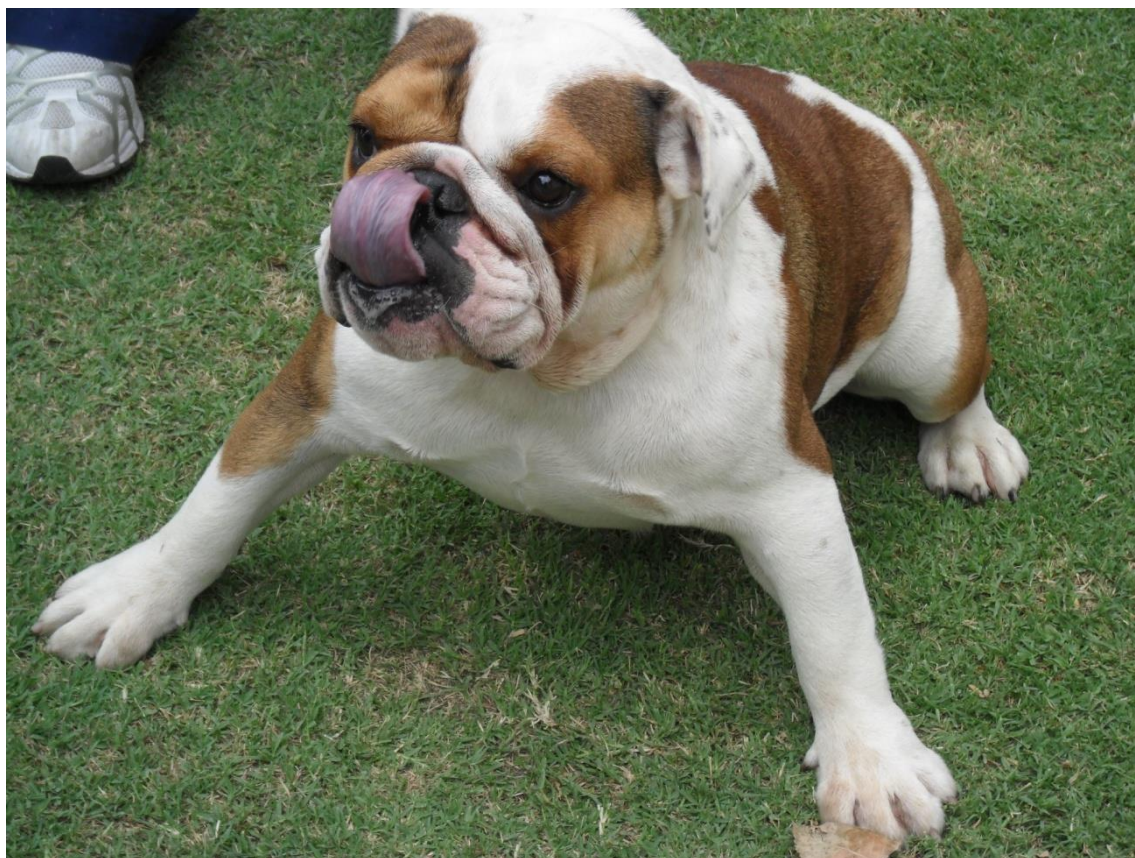
- Savignone, C. A.; Reyna, J. C.; Stornelli, M. C.; Tittarelli, C. M.; Nuñez Favre, R.; García Mitacek, M. C.; de la Sota, R. L. y Stornelli, M. A. (2007). "Presencia de mucopolisacaridos en el epitelio epididimal del gato domestico en diferentes epocas del año.". En *XXIV Jornadas Científicas de la Asociación de Biología de Tucumán*. (165).
- Smith, A.; Bugge, H. P.; Berg, K. A.; Moller, O. y Hansson, V. (1986). "Seasonal changes in testicular structure and function in the blue fox (*Alopex lagopus*), as quantified by morphometric analysis and measurement of adenylate cyclase activity." *Int J Androl* 9 (1), pp. 53-66.
- Smith, A. J.; Clausen, O. P.; Kirkhus, B.; Jahnsen, T.; Moller, O. M. y Hansson, V. (1984). "Seasonal changes in spermatogenesis in the blue fox (*Alopex lagopus*), quantified by DNA flow cytometry and measurement of soluble Mn²⁺ -dependent adenylate cyclase activity." *J Reprod Fertil* 72 (2), pp. 453-461.
- Spindler, R. E. y Wildt, D. E. (1999). "Circannual variations in intraovarian oocyte but not epididymal sperm quality in the domestic Cat." *Biol Reprod* 61 (1), pp. 188-194.
- Stetson, M. H. y Tate-Ostroff, B. (1981). "Hormonal regulation of the annual reproductive cycle of golden hamsters." *Gen Comp Endocrinol* 45 (3), pp. 329-344.
- Stetson, M. H.; Watson-Whitmyre, M. y Matt, K. S. (1977). "Termination of photorefractoriness in golden hamsters-photoperiodic requirements." *J Exp Zool* 202 (1), pp. 81-88.
- Stetson, M. H.; Watson-Whitmyre, M. y Tate-Ostroff, B. (1983). "Role of the pineal and its hormone melatonin in the termination of photorefractoriness in golden hamsters." *Biol Reprod* 29 (3), pp. 689-696.
- Stornelli, M. A. (2007). "Basic and advanced evaluation of cat's semen." *Brazilian J. Anim. Reprod.* (31), pp. 135-140.
- Stornelli, M. A.; Reyna, J. C.; Stornelli, M. C.; Nunez Favre, R.; Savignone, C. A.; Tittarelli, C. M. y de la Sota, R. L. (2009). "Seasonal changes in testicular cell morphology in domestic male cats (*Felis catus*). " *Reprod Domest Anim* 44 Suppl 2 287-290.
- Stornelli, M. A.; Stornelli, M. C.; Savignone, C. A.; Tittarelli, C. M.; Reyna, J. C. y de la Sota, R. L. (2004). "Influencia del fotoperíodo en la cantidad de espermatozoides epididimales en gatos." En *I Congreso y IV Jornada Nacional de Felinos*. (19-20). Corrientes:
- Thiery, J. C.; Chemineau, P.; Hernandez, X.; Migaud, M. y Malpoux, B. (2002). "Neuroendocrine interactions and seasonality." *Domest Anim Endocrinol* 23 (1-2), pp. 87-100.
- Tittarelli, C. M.; Savignone, C. A.; Stornelli, M. A.; Stornelli, M. C.; Desmarás, E. y de la Sota, R. L. (2004). "Concentración y viabilidad de espermatozoides epididimales felinos en diferentes épocas del año." En *VII Reunión Interamericana de Cátedras de Fisiología Animal*. (106). La Pampa:
- Tsutsui, T.; Murao, I.; Kawakami, E.; Ogasa, A. y Stabenfeldt, G. H. (1990). "Androgen concentration in the blood and spermatogenic function of tom cats during the breeding season." *Nippon Juigaku Zasshi* 52 (4), pp. 801-806.

- Tsutsui, T.; Onodera, F.; Oba, H.; Mizutani, T. y Hori, T. (2009). "Plasma hormone levels and semen quality in male cats during non-breeding and breeding seasons." *Reprod Domest Anim* 44 Suppl 2 291-293.
- Vandenbergh, J. G. (1976). "Acceleration of sexual maturation in female rats by male stimulation." *J Reprod Fertil* 46 (2), pp. 451-453.
- Verstegen, J. P. (1998). "Physiology and endocrinology of reproduction in female cats.". En *Small animal reproduction and neonatology*. (pp. 105-111). Cheltenham, United Kingdom.
- Vieytes, M. (1995). "La glándula pineal.". En *Fisiología veterinaria*. (pp. 696-706). Nueva York: Interamericana McGraw-Hill.
- Wildt, D. E.; Bush, M.; Howard, J. G.; O'Brien, S. J.; Meltzer, D.; Van Dyk, A.; Ebedes, H. y Brand, D. J. (1983). "Unique seminal quality in the South African cheetah and a comparative evaluation in the domestic cat." *Biol Reprod* 29 (4), pp. 1019-1025.
- Zambelli, D. y Cunto, M. (2006). "Semen collection in cats: techniques and analysis." *Theriogenology* 66 (2), pp. 159-165.

CAPÍTULO 10

Gestación en la perra y en la gata

María Cecilia Stornelli - María Carla García Mitacek



Gestación en la perra

Introducción

El conocimiento de los eventos fisiológicos que ocurren a lo largo de la gestación permite el adecuado manejo y control sanitario durante la misma, así como la posibilidad de realizar el diagnóstico e implementar el tratamiento de las enfermedades que pueden ocurrir durante este estadio. El manejo de la hembra gestante comienza en el momento del servicio. Por lo tanto, es importante conocer los eventos fisiológicos y endocrinológicos que ocurren durante la preñez.

Solo animales normales y en excelente condición corporal deberían ser usados en programas de reproducción ya que el estado de salud, condición corporal, nutrición y edad afectan la fertilidad (Johnson, 2008). Se han observado mayores tasas de concepción y tamaños de camada y menor mortalidad neonatal en hembras de entre 2 y 3.5 años. Después de los cinco años de edad, disminuyen las tasas de preñez, tamaños de camada y se incrementan las muertes en los neonatos. El tamaño de camada está relacionado también con el número de partos, ya que se observó mayor tamaño de camada luego del tercer o cuarto parto (Bovic Gavriolovic, 2008; Johnson, 2008; Kelley, 2002). En las perras el tamaño de camada está también asociado a la raza, ya que razas de talla grande tendrán camadas más grandes que las de talla pequeña. Por otra parte la obesidad se asocia a una baja tasa de concepción, menor tamaño de camada y alto riesgo de distocia (Jhonson, 2008).

Varios eventos relacionados con la gestación canina, son únicos y diferencian a los cánidos de otras especies. Estos hechos incluyen: el retardo en la maduración de los ovocitos hasta después de la ovulación, el retardo en la implantación de los embriones, el incremento en la progesterona sérica asociado con la luteinización preovulatoria de los folículos, la ausencia de proteínas específicas de la preñez y la producción de relaxina exclusivamente por la placenta. Luego de la ovulación, los ovocitos permanecen viables por 3-5 días, por lo tanto la fertilización ocurre 6-8 días luego de la ovulación y 10-11 días después de la onda preovulatoria de LH (Versterger-Onclin, 2008).

En la perra la identificación del primer día del diestro mediante citología vaginal se utiliza para predecir el parto, el cual ocurrirá 57 ± 3 después del diestro citológico. Por otra parte, si

consideramos el pico preovulatorio de LH (día cero), el parto ocurrirá y 65 ± 1 después del mismo (de Gier, 2006).

El adecuado conocimiento de los factores endócrinos y sus mecanismos de acción durante la preñez permitirán el manejo seguro de la misma (Verstegen, 2008).

Mantenimiento de la preñez

En la perra, el mantenimiento de la preñez depende de la secreción de progesterona y los ovarios son la única fuente de esta hormona en la hembra canina. No ocurre secreción de progesterona placentaria como en otras especies, por lo tanto si se realiza ovariectomía durante la preñez ocurrirá reabsorción o aborto.

La secreción de progesterona por el cuerpo lúteo es regulada por factores luteotrópicos y luteolíticos y la mayor fuente de factores luteotróficos es la hipófisis. Si bien el cuerpo lúteo canino parece ser menos dependiente de la pituitaria durante la primera mitad del diestro, es necesario el soporte luteotrófico durante la segunda mitad del mismo.

La hipofisectomía induce aborto durante los primeros diez días de gestación pero es incapaz de afectar la función del cuerpo lúteo luego de este período. De forma similar las drogas luteolíticas (agonistas dopaminérgicos, antagonistas GnRH y prostaglandinas) son incapaces de inducir luteólisis en dicho período (Verstegen, 2008).

Aunque se considera a prolactina como el principal factor luteotrópico en la perra, la secreción lútea de progesterona depende de dos factores hipofisarios, LH y prolactina. Es así que la secreción de progesterona puede disminuir debido a la administración de anti LH, o por drogas que disminuyen la concentración de prolactina sérica (Johnston y col, 2001; Verstegen, 2008). Además, como ocurre en otras especies, en la perra, la administración de prostaglandina F2 α es luteolítica a partir del segundo tercio (mitad) de la gestación (Okkens y col., 1986; Polisca y col.; 2010).

Durante la segunda mitad de la fase lútea, el cuerpo lúteo depende intensamente del soporte hipofisario y es prolactina la hormona luteotrófica crucial desde el día 25, después del pico preovulatorio de LH. Antes de este período el cuerpo lúteo es independiente del soporte luteotrófico, y la producción local (intra cuerpo lúteo), de prostaglandinas parece ser uno de los factores luteotróficos más importantes durante el mismo. Por lo tanto la formación del cuerpo lúteo se asocia con un aumento en la ciclooxigenasa 2 y prostaglandina E2 (PGE2), acompañado de un incremento progresivo de proteína reguladora de la esteroidiogénesis (STAR) y 3β esteroideo deshidrogenasa. Es así que en los perros el rol de las prostaglandinas intraluteales, está más ligado a la formación del cuerpo lúteo que a la luteólisis (Kowalsky, 2015).

Por otra parte, en esta especie no han sido identificados factores luteotróficos uterinos y la ausencia de estos factores no parece alargar el diestro (Hoffman y col., 1992; Johnston y col., 2001).

Sin bien, antes del día 10 de gestación, no se logra la luteólisis luego de la administración de agonistas dopaminérgicos, antagonistas GnRH o prostaglandina, las causas de esta independencia del cuerpo lúteo aún no se conocen (Fernandes y col., 1997).

Para el mantenimiento de la preñez es necesario que la concentración sérica de progesterona supere los 2ng/ml. La progesterona induce la secreción de las glándulas endometriales y la diferenciación y mantenimiento de la integridad del endometrio para asegurar la adecuada unión de la placenta. Por otra parte, esta hormona suprime la contractibilidad del endometrio al prevenir la acción uterogénica de los estrógenos (Concannon, 1986; Concannon y col., 1997; Hoffman y col., 2004).

Endocrinología durante la gestación

Progesterona

Las concentraciones de progesterona sérica en la hembra preñada son similares a las de la perra en diestro, por lo tanto esta hormona no puede ser utilizada como indicador de preñez en la hembra canina. En la hembra no preñada durante el diestro temprano y medio se alcanzan las concentraciones de progesterona sérica mayores para luego disminuir gradualmente hasta valores basales entre 51 y 82 días después del pico de LH. En la perra preñada ocurren concentraciones similares de progesterona sérica hasta 24 a 48 horas antes del parto momento en el cual la concentración sérica de progesterona cae de manera abrupta hasta niveles basales (<1 ng/ml).

La declinación abrupta de la progesterona antes del parto, la cual puede ser monitoreada mediante la observación de la disminución de la temperatura rectal (1°C), se debe a la ocurrencia de luteólisis y esto permite la ocurrencia del parto (Johnston y col., 2001).

Prolactina

Prolactina es la principal hormona de la pituitaria implicada en el mantenimiento de la esteroidogénesis, por el cuerpo lúteo. Las concentraciones de prolactina sérica se elevan en la gestación media y permanecen elevadas durante el resto de la gestación y la lactancia (Verstegen y col., 2008). Por otra parte las concentraciones de prolactina permanecen bajas durante la mayor parte del diestro en las perras no preñadas (< 2ng/ml), para aumentar entre

dos y tres veces en el diestro tardío. En las perras no preñadas, se considera a prolactina como responsable de los signos (lactancia, realización del nido), y de los cambios fisiológicos observados durante la misma. Tsusui y col observaron que prolactina se encontró elevada en muchas perras con pseudopreñez clínica, al tratar a las perras con agonistas dopaminérgicos los signos desaparecían. Por otra parte en algunas de las perras con pseudogestación clínica prolactina tuvo concentraciones séricas bajas. Este hecho puede deberse a la secreción pulsátil de prolactina durante el diestro pero también podría reflejar un incremento en la sensibilidad a prolactina más que un incremento de la misma (Johnston y col., 2001; Lee y col., 2006; Tsusui, 2007).

Estrógeno

El rol de 17β estradiol en la regulación del cuerpo lúteo canino no se conoce con claridad. Algunos autores comunican elevaciones de estradiol entre los días 10 y 64 del diestro, mientras que otros observaron elevaciones de esta hormona durante la preñez pero no durante la fase lútea de perras no preñadas. La concentración total de estrógeno sérico durante el diestro, fue comunicada como constante en perras no preñadas, mientras que se observó una elevación en las últimas tres semanas de la gestación. Onclin y col, comunicaron concentraciones séricas de 17β estradiol de entre 21 y 24 pg/ml durante la fase lútea. Estos valores comenzaron a descender a partir del día 60, no observándose diferencias entre perras preñadas y no preñadas (Onclin y col., 2002). Si bien no se conoce el origen del incremento de estradiol, probablemente su origen sea el cuerpo lúteo y es probable que como ocurre en otras especie, estradiol, prolactina y LH formen un complejo luteotrófico. Sin embargo Concannon y col (Concannon y col., 2001; Verstegen y col., 2008) observaron que cuando se administró progesterona en forma de implantes subcutáneos, antes de que ocurra la implantación y luego se realizó la ovariectomía, la implantación ocurrió normalmente y la gestación llegó a término (Verstegen y col., 2008). Por otra parte los estudios realizados hasta la actualidad indican que a diferencia de lo que ocurre en otras especies, la placenta no contribuye con la elevación de estrógenos en las perras preñadas (Johnston y col., 2001).

Andrógenos

Las concentraciones séricas de testosterona se incrementan durante el proestro coincidiendo su pico máximo con el del pico preovulatorio de LH, para luego declinar durante la fase lútea. Por otra parte las concentraciones de androstenediona se incrementan durante el

estro y diestro temprano para luego disminuir entre los días 30 y 40 del diestro tanto en perras preñadas como vacías. (Concannon, 2011; Concannon y Castracane, 1985).

Relaxina

Se comunicó la presencia de relaxina en suero de perras preñadas y cachorros lactantes, por otra parte, relaxina no fue detectada en plasma de perras en anestro, perras no preñadas en diestro, así como en machos.

En perras preñadas, relaxina se eleva desde 21 a 24 días después del pico de LH hasta el final de la gestación alcanzando su concentración máxima dos a tres semanas antes del parto para después disminuir y persistir así por cuatro a nueve semanas luego del nacimiento. Relaxina es la única proteína específica de la preñez en la perra.

Si bien, se hallaron altas concentraciones de relaxina solo en placenta, esta hormona también fue detectada en ovarios y leche de perras gestantes.

La determinación de relaxina sérica ha sido sugerida para el diagnóstico de gestación en la perra, pero debido a que la misma puede ser detectada en suero recién la tercer o cuarta semana de preñez, el diagnóstico de la misma se realiza de manera más temprana implementando otros métodos como palpación y ultrasonografía (Concannon, 2011; Verstegen y col., 2008).

Hormona Luteinizante (LH)

Las concentraciones séricas de LH, se incrementan durante el diestro tardío, tanto en perras preñadas como no preñadas.

Hormona folículo estimulante (FSH)

La concentración sérica de FSH, declina a valores por debajo de 150 ng/ml 17 días luego del primer día del diestro en perras vacías. Mientras que en hembras preñadas se mantiene por encima de 150 ng/ml (Kustritz, 2005).—Onclin y col, observaron que las concentraciones séricas de FSH, se incrementaron nuevamente luego del pico de LH, hacia el final del estro en las perras vacías y se mantuvieron en valores de entre 3 y 6 ng/ml durante el diestro, mientras que en las perras preñadas las concentraciones séricas de FSH se incrementaron durante los días 40 y 65 de gestación, alcanzando valores de 10

ng/ml para luego disminuir abruptamente al aproximarse el parto, permaneciendo en valores basales durante toda la lactancia (Onclin y col., 2002).

Períodos de la gestación

Phemister dividió gestación canina en tres períodos: 1) Período de cigoto: abarca desde el día 2 al 17, es el período que le sigue a la fertilización se caracteriza por blastocistos libres en las trompas uterinas, que migran hacia el útero. 2) Período embrionario: desde el día 19 al 35, comienza con la implantación de los blastocistos y termina cuando se completa la organogénesis. 3) Período fetal: se extiende desde la osificación fetal hasta el parto (Pretzer, 2008).

1) Fertilización y período embrionario temprano

Se corresponde con el primer tercio de gestación y en este período el diagnóstico de preñez es dificultoso. Este período se caracteriza por la refractariedad del cuerpo lúteo a los tratamientos exógenos (Hoffman y col., 1986; Okkens y col., 1992). En la etapa inicial de este período ocurre la maduración de los ovocitos, la cual se produce aproximadamente dos días después de la ovulación y cuatro días después del pico preovulatorio de LH. La fertilización de los ovocitos maduros, ocurre en el oviducto y la mórula desarrolla en blastocisto en distal del mismo para luego entrar al útero 10 a 12 días después del pico preovulatorio de LH (Concannon, 2011).

Los embriones permanecerán libres en la luz uterina, migrando dentro de los cuernos y absorbiendo los nutrientes de la "leche uterina" producida por las glándulas endometriales que se encuentran bajo la influencia de concentraciones crecientes de progesterona (Verstegen y col., 2008). Por un mecanismo que aún no se conoce completamente los blastocistos se unen al endometrio 18 a 20 días después del pico de LH completando la implantación (invasión del endometrio por el trofoblasto fetal) entre los días 20 y 22 después del pico de LH.

La presencia de reacciones inflamatorias localizadas con congestión e hipervascularización pueden observarse en muestras histológicas entre los días 10 y 14 tanto en los cuernos como en el cuerpo del útero. Si bien en la perra no han sido demostradas señales de reconocimiento materno-fetal, se ha comunicado que estos podrían ser sitios para la futura implantación y estas reacciones localizadas podrían indicar alguna forma de comunicación entre el útero y el embrión (Verstegen y col., 2008).

2) Período embrionario tardío

Entre los días 20 y 22 de gestación se desarrolla la placenta que en la perra es decidua modificada, endoteliocorial zonal (circunferencial). En los bordes de la banda zonal pueden observarse hematomas que se forman a partir de los lechos vasculares maternos donde la hemoglobina se metaboliza a uteroverdina. Este pigmento de coloración negro-verdusca es característico de la placenta de carnívoros. El embrión obtiene algunos metabolitos de estas áreas principalmente hierro (Wimsatt, 1975).

A partir del día 22, el cuerpo lúteo se vuelve sensible a tratamientos o diversos factores que pueden interferir en forma directa o indirecta con su función y el feto es sensible a drogas que puedan afectar su desarrollo o la función uterina. Es así que en este período puede inducirse fácilmente el aborto.

En este estadio ocurre la gastrulación o formación de capas germinales, así la blástula de una única capa se transforma en una estructura trilaminar constituida por una capa externa o ectodermo, una media o mesodermo y una interna o endodermo.

El ectodermo se diferencia en la epidermis y el tubo neural, el endodermo en las capas que revisten los tractos respiratorio y gastrointestinal y el mesodermo en las capas de los aparatos circulatorio y urogenital los sistemas de soporte muscular y esquelético. Los órganos del sistema reproductivo se diferencian del ectodermo y mesodermo (McGeady y col., 2006; Senger, 2003). Antes del día 30 de gestación hay poca diferenciación anatómica dentro del embrión, pudiendo solo observarse el latido cardíaco y un área anecoica en la cabeza (Pretzer, 2008). Los primeros órganos abdominales detectables son el estómago y la vejiga urinaria los días 31.2 ± 1.6 (29–33) y 32.6 ± 1.8 (31–35), respectivamente. El esqueleto puede ser observado como una estructura hiperecoica el día $34,9 \pm 1,6$ (Holst y col., 1974; Yeager y col., 1992; Yeager y col., 1995).

El día 23 de gestación el embrión tendrá 10 mm de largo, y se desarrolla el esbozo de los miembros torácicos, los procesos mandibular y maxilar y la placoda ótica y del cristalino. El día 25, medirá 14 mm y se forma la cresta mamaria y la lámina dental. El día 28 el embrión medirá 17 mm y puede observarse osificación en: maxilar, mandíbula y hueso frontal. El día 30, con 19 mm están formados los párpados, oído externo, pelos sensoriales en el hocico, mentón y cejas. En este momento, los intestinos crean por encima del espacio que disponen en la cavidad abdominal y ocurre la herniación umbilical. En este período también se desarrolla un tubérculo genital prominente. El día 33 de gestación y con una longitud de 33 mm, el embrión completó la osificación y ocurrió la fusión de los palatinos (Pretzer, 2008).

3) Período de feto

Este período se extiende desde el día 35 de gestación hasta el parto. El feto se encuentra bien desarrollado, osificado y su peso corporal aumenta exponencialmente (Foto 1 y 2). En este estadio se desarrolla la pigmentación, crecen el pelo y las garras; se produce el cierre y fusión de los párpados, crecimiento del oído externo, elongación del tronco y diferenciación sexual.

Durante este período el cuerpo lúteo es muy dependiente del soporte luteotrófico de la pituitaria, cualquier cambio en la concentración de prolactina, LH o en el equilibrio hormonal puede redundar en una pérdida en la función del cuerpo lúteo y falla en la preñez (Pretzer, 2008; Vestergén y col., 2008).

Conclusiones

Si bien se han logrado grandes avances en la comprensión de los diversos mecanismos endócrinos involucrados en la gestación, existen aún eventos que deben ser estudiados, tales como el rol de FSH, LH y prolactina durante la gestación, el rol de la relaxina en relación al control de la prolactina y la función del cuerpo lúteo así como la presencia de factores embrionarios que regulan los eventos pre implantación y la función del cuerpo lúteo.

El conocimiento de los diversos eventos, fisiológicos y endocrinológicos que ocurren durante la gestación permite el adecuado manejo de la hembra gestante, así como el diagnóstico precoz de las enfermedades que pueden afectarlas, con el consiguiente diagnóstico temprano de las mismas, lo que posibilitará un incremento en la sobrevivencia tanto de la hembra como de los cachorros.

Gestación en la gata

Particularidades fisiológicas de la gestación en la gata

La gestación puede ser definida como el período entre la fecundación y el nacimiento de las crías, durante el cual se produce el desarrollo embrionario y fetal. En el caso de la gata, éste período se realiza por completo dentro del útero.

La gata a diferencia de la perra, ovula ovocitos secundarios, los cuales permanecen en los oviductos durante 5 a 6 días, lugar donde ocurre la fertilización (Feldman y Nelson, 2000). Se ha descrito que la tasa de ovulación en la gata sería de 2-11 ovocitos con un promedio que varía entre 5.6 ± 1.9 (Tsutsui y col., 1989). Poco después de la fecundación, el cigoto comienza a dividirse mientras recorre el oviducto hacia el útero. Entre 60 a 68 h luego de la de la cópula se observan embriones de 1 a 2 células, 76 h más tarde se observan embriones de 5 a 8 células y a las 100 h los embriones poseen entre 9 y 16 células. A las 124 h se observan mórulas en nivel del oviducto las cuales a las 148 h se compactan observándose blastocistos tempranos que atraviesan la unión uterotubárica, ubicándose en el cuerno uterino [Figura 1] (Knospe, 2002; Swanson y col., 1994). Las divisiones continúan y comienza la producción de líquido que dará a lugar a la formación de una cavidad o blastocelo en el interior de la masa de células. Esta etapa en la que el embrión aún se encuentra rodeado por la zona pelúcida, recibe el nombre de blastocisto y en él se diferencian según su posición dos poblaciones de células, una el nódulo embrionario que da origen al embrión propiamente dicho, y otra la situada periféricamente que origina el trofoblasto, el cual interviene en la ingestión selectiva de nutrientes y que formará posteriormente el corion. Luego se produce la ruptura de la zona pelúcida y la salida del embrión por el punto de rotura. Entre las causas de rotura se encuentran el crecimiento y expansión del blastocisto y el aumento de líquido en el blastocelo. El blastocisto eclosionado, que se ha desprendido de la zona pelúcida, comienza una fase de alargamiento de rápido crecimiento, pasando de una forma esférica a una tubular o filamentosa. Los embriones se mueven en el útero en busca de un lugar adecuado para implantarse (García Sacristan y col., 1995). Se considera que la implantación ocurre entre los 12 a 13 días posteriores a la ovulación (Johnston y col., 2001). El pasaje de embrión a feto ocurre alrededor de los 28 días posteriores a la fecundación (Illanes y col., 2007). La duración de la gestación oscila entre 52 y 74 días después del servicio con un promedio de 66 días (Jemmett y Evans 1977; Munday y Davidson, 1993, Prescott, 1973; Rott y col., 1995). El tamaño de la camada varía entre 1 y 5 crías, con promedios de 3.3-3.5 gatitos por camada (Schmidt y col., 1983; Munday y Davidson, 1993; Root y col., 1995).

Endocrinología de la gestación en la gata

Uno a dos días postovulación la concentración de P_4 plasmática aumenta por encima de la concentración basal (< 1 ng/mL) siendo de 2 ng/mL. La P_4 continúa aumentando siendo la concentración de 15 a 30 ng/mL entre los 25 y 30 días de gestación (Johnston y col., 2001). Ésta hormona mantiene valores estables hasta aproximadamente el día 60, momento en que la concentración de P_4 disminuye abruptamente, coincidiendo con el día del parto (Verstegen, 1998). Estos resultados concuerdan con el trabajo realizado por García Mitacek (2013) en el cual se analizaron las concentraciones séricas de P_4 desde el día 21 al 63 de gestación. La concentración más alta (35.52 ± 6.14 ng/mL) pudo observarse el día 21 de gestación. Entre el día 22 al 47 de gestación los niveles se mantuvieron en un rango entre 32.27 ± 4.25 y 16.25 ± 2.45 ng/mL. Sin embargo, a partir del día 48 de preñez los niveles séricos de P_4 comenzaron a disminuir gradualmente, llegando a valores entre 9.82 ± 1.00 y 6.19 ± 1.98 ng/mL entre el día 53 al 62 de gestación, mientras que al día 63 se obtuvo un nivel de P_4 sérica de 4.76 ± 0.33 ng/mL (García Mitacek, 2013). La elevada progesteronemia durante la gestación es un reflejo de la función lútea continua así como de la P_4 sintetizada y secretada por la placenta. El cuerpo lúteo produce P_4 durante un mínimo de 40 a 50 días, pero las cantidades elaboradas después del día 49 son escasas. A partir del día 50 la P_4 placentaria sería capaz de mantener la gestación (Feldman y Nelson, 2000). Recientemente Siemieniuch y col. (2012) comunicaron que la placenta es una fuente adicional de P_4 en las gatas preñadas. En dicho estudio pudieron determinar que la concentración de P_4 placentaria es baja durante la gestación temprana, incrementándose la concentración de dicha hormona a la largo de la misma. Estos resultados muestran que la placenta podría ser considerada un importante órgano endocrino para el mantenimiento la preñez en las gatas (Siemieniuch y col., 2012).

Durante la fase folicular, la estrogenemia se incrementa con rapidez, permanece elevada por 3 a 4 días, para luego de manera brusca comenzar a decaer. Durante los primeros 5 días después de la cópula se reduce a niveles basales (8 a 12 pg/mL), manteniendo estos valores hasta el día 58 y 62 de la gestación, momento en el cual se produce un leve incremento, llegando a niveles de 20 a 30 pg/mL, para comenzar a descender justo antes del parto (Feldman y Nelson, 2000; Johnston y col., 2001).

Las altas concentraciones de E_2 y P_4 , en general, inhiben la producción de gonadotrofinas hipofisarias, por lo que los niveles de FSH y LH son muy bajos durante la gestación (García Sacristan y col., 1995).

La relaxina es una hormona peptídica la cual es producida por la unidad fetoplacentaria. La misma es detectada a partir del día 25 de gestación, y comienza a declinar 10 a 15 días previo al parto. La concentración de relaxina no es detectada en el suero durante el estro, pseudopreñez y dos días post parto, por lo cual permitiría realizar el diagnóstico de gestación en la gata (Feldman y Nelson, 2000). Ésta hormona actúa en sinergismo con la P_4 para el

mantenimiento de la gestación, previniendo las contracciones espontáneas del útero. Así mismo, la relaxina actúa estimulando la producción de enzimas colagenolíticas, ablandando el tejido conectivo que circunda a la pelvis, lo cual facilita la máxima expansión del canal del parto durante el nacimiento de las crías (García Sacristan y col., 1995).

La prolactina es luteotrófica y ayuda al mantenimiento del cuerpo lúteo después del día 15 de gestación. El incremento de los niveles de prolactina en suero se observan a partir del día 35 de preñez (Verstegen, 1998).

Placentación en la perra y la gata

La placenta es un órgano transitorio, compuesto por componentes fetales derivados del corion y componentes maternos derivados de la modificación del endometrio (Senger, 2003). La placenta además de ser un órgano de intercambio metabólico, es considerada un órgano endocrino transitorio, debido a que produce hormonas que pueden estimular la función ovárica, mantener la gestación, influir en el crecimiento fetal, estimular la función mamaria así como intervenir en el parto (Senger, 2003).

Una vez que se ha establecido la orientación de los blastocistos, estos invaden la mucosa uterina. En una primera fase ocurre la aposición entre el trofoectodermo y el epitelio del lumen uterino, luego se inicia la fase de adhesión por interdigitación de microvellosidades uterinas con la membrana trofoblástica y finalmente ocurre la invasión de la mucosa uterina. La invasión del endometrio implica la penetración de la lámina basal epitelial por el trofoblasto, el cual rodeará los vasos sanguíneos del estroma. La invasión es intrusiva, es decir, proyecciones del sincicio trofoblástico penetran en el espacio intercelular del endometrio sin lisis celular (Faber y Thornburg, 1983).

La perra y la gata presentan una placenta endoteliorial zonal. Esta denominación surge a partir de las características macroscópicas y microscópicas de la misma. Desde el punto de vista microscópico, se denomina endoteliorial, debido a que los capilares maternos están directamente expuestos a las células epiteliales del corion embrionario, mientras que desde el punto de vista macroscópico se denomina zonal completa, debido a que la placenta se dispone en forma anular alrededor del corion abarcando la parte media del conceptus. La relación anatómica entre los microvasos maternos y fetales es fisiológicamente importante, ya que la microvasculatura abastece aquellas áreas de la placenta donde ocurre el intercambio difusional. Las vellosidades de la superficie del corion se introducen ampliamente entre las criptas endometriales hasta descansar en el endotelio de los vasos uterinos. Este tipo de distribución de la microvasculatura se conoce como laberíntica; además, a lo largo de ambos bordes de la zona placentaria ocurre ruptura de vasos sanguíneos maternos, acumulándose sangre en la periferia de la placenta, lo que se denomina borde hemocorial o hematoma marginal (Faber y Thornburg, 1983).

Diagnóstico de gestación en la perra y la gata

El diagnóstico de gestación puede realizarse por ultrasonografía, palpación abdominal, estudios hormonales y estudios radiográficos. La utilización de cada uno de ellos dependerá del momento de la gestación en el cual se realizará el diagnóstico o control de la preñez, así como también de los medios con los que se cuentan para tal fin (Feldman y Nelson, 2000). En el caso de la perra se pueden estimar los días de gestación teniendo en cuenta el pico de LH, sin embargo, en la actualidad los kits comerciales para la medición de dicha hormona son costosos. Por lo tanto, un método económico y sencillo consiste en realizar un seguimiento citológico a partir del cual se determine el primer día del diestro. La determinación del primer día diestro citológico nos servirá para poder indicarles a los propietarios o criadores cual es el día adecuado para poder utilizar los diferentes métodos complementarios y de ésta forma confirmar la preñez en forma segura, sin la necesidad de volver a repetir el método por ser demasiado temprano para su aplicación diagnóstica.

Ultrasonografía

El diagnóstico de gestación mediante ultrasonografía puede realizarse a partir del día 23 luego del primer día del diestro citológico en la perra (Nyland y Mattoon, 2002; Zambelli y Prati, 2006; Nelson y Couto, 2000); y entre los 18-21 días posteriores al servicio en la gata (Nyland y Mattoon, 2002).

Para más detalle de la evaluación ultrasonográfica de la gestación, remitirse al capítulo: “Ultrasonografía reproductiva en pequeños animales”.

Palpación abdominal

El diagnóstico de gestación mediante palpación abdominal puede realizarse a partir del día 20 luego del primer día del diestro en la perra; y entre los 21-25 días posteriores al servicio en la gata (England, 1998). A esta edad gestacional se pueden palpar vesículas gestacionales de forma esférica que miden aproximadamente 2.5 cm de diámetro, siendo fácil el reconocimiento de las mismas. Los sacos gestacionales pueden palparse hasta el día 30 a partir del primer día del diestro citológico. Sin embargo, a partir de los 30 días posteriores al primer día del diestro, los sacos gestacionales se elongan y el útero tiene un agrandamiento más difuso, lo cual dificulta la detección de la gestación mediante esta técnica (Feldman y Nelson, 2000; Nelson y Couto, 2000).

La palpación abdominal es una técnica sencilla, rápida y económica. Si bien es el método más subjetivo para el diagnóstico de gestación, es confiable si el operador está bien entrenado. La facilidad con la cual se puede palpar el abdomen en forma precisa está influenciada por factores como cantidad de grasa corporal, la conformación y el temperamento del paciente (Nelson y Couto, 2000).

Estudios hormonales

La relaxina es una hormona específica de la gestación y la detección de altas concentraciones séricas podría utilizarse para el diagnóstico de gestación a partir del día 28 del primer día del diestro citológico en la perra; y a partir del día 25 posterior al servicio en la gata. En la actualidad no está disponible el kit comercial en el mercado nacional (Feldman y Nelson, 2000; Nelson y Couto, 2000; England, 1998).

La medición de la concentración sérica o plasmática de P_4 , en la perra o en la gata no resulta útil para realizar el diagnóstico de gestación, debido a que las concentraciones séricas o plasmáticas de progesterona durante el diestro en la perra o durante la pseudogestación en la gata no se diferencian de los valores existentes durante la preñez. Es decir en la perra durante el diestro o en la gata durante la pseudopreñez se produce un incremento de los niveles de ésta hormona similar a lo ocurrido durante la gestación.

Estudios radiográficos

El diagnóstico de la preñez por medio de la radiografía puede realizarse a partir del día 50 después del primer día del diestro en la perra y 45-50 días posteriores al servicio en la gata, debido a que a partir de este momento ocurre la mineralización ósea fetal, permitiendo realizar el conteo de los fetos gestados (Foto 2). El número de fetos gestados es un dato importante ya que nos permitirá a través de la observación y control del parto conocer si todos los fetos gestados han sido expulsados. Así mismo el estudio radiológico nos permitirá detectar algunas anomalías fetales y estimar el tamaño fetal pudiendo establecerse la probabilidad de distocia asociada a estos datos.

El tamaño, forma y radio-opacidad del útero varía con el número de fetos y el estadio de la gestación (Johnston y col., 2001; England, 1998).

Bibliografía

- Beck, KA.; Baldwin, CJ.; Bosu, WTK. (1990) "Ultrasound prediction of parturition in queens". Veterinary Radiology. (31) pp. 32-35.
- Bobic Gavrilovic, B.; Andersson, K., Forsberg, LC. (2008). "Reproductive patterns in the dog—a retrospective study of the Drever breed". Theriogenology (70) pp.783–94.
- Concannon, PW. (1986). "Clinical and endocrine correlates of canine ovarian cycles and pregnancy". "En": Kirk RW, editor. Current veterinary therapy small animal practice, IX. Philadelphia: Saunders; pp. 1218.
- Concannon, PW.; Castracane, VD. (1985). "Serum androstenedione and testosterone concentrations during pregnancy and nonpregnant cycles in dog". Biology of reproduction. (33), pp. 1078-1083.
- Concannon, PW.; Powers, ME.; Holder, W.; Hansel, W. (1977). "Pregnancy and parturition in the bitch". Biol Reprod (19), PP.517–26.
- Concannon, P. W. (2011). "Reproductive cycles of the domestic bitch". Animal Reproduction Science (124), pp. 200–210.
- Concannon, P.; Tsutsui, T.; Shille, V. (2001). "Embryo development, hormonal requirements and maternal responses during canine pregnancy". J Reprod Fertil. (57), pp.169–79.
- de Gier, J.; Kooistra, HS.; Djajadiningrat-Laanen, SC.; Dieleman, SJ.; Okkens, AC. (2006). "Temporal relations between plasma concentrations of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, estradiol-17b, progesterone, prolactin, and α -melanocyte-stimulating hormone during the follicular, ovulatory, and early luteal phase in the bitch". Theriogenology. (65) pp. 1346–1359.
- England G. (1998). "*Pregnancy diagnosis, abnormalities of pregnancy and pregnancy terminatio*". En Simpson GM, England GCW, Harvey M, editores. Manual of small animal reproduction and neonatology. (p. 113-126). United Kingdom, British Association.
- Faber, JJ.; Thornburg, KL. (1983). "Placental Physiology. Structure and Function of Fetomaternal Exchange". Raven Press, New York.
- Feldman, EC.; Nelson, RW. (2000). "Reproducción de gatos". En: Feldman EC, Nelson RW. Endocrinología y reproducción en perros y gatos. 2da Edición, (p. 806-836). México, Mc Graw-Hill Interamericana.
- Fernandes, PA.; Bowen, RA.; Kostas, AC.; Sawyer, HR., Nett, TM.; Olson, PN. (1997). "Luteal function in the bitch". Biol Reprod (37), pp.804–11.
- García Mitacek, MC.; Praderio, RG.; Bonaura, MC.; de la Sota, RL.; Stornelli, MA. (2012). "Relación entre parámetros ultrasonográficos y edad gestacional en la gata doméstica". Analecta Veterinaria. 32 (2) pp. 5-10.

- García Mitacek, MC. (2013). "Efecto de cloprostenol y aglepristone sobre la gestación temprana y media en felinos. Estudios clínicos, endocrinológicos y ultrasonográficos". Tesis Doctoral. FCV. UNLP.
- García Sacristan, ACM.; de la Cruz Palomino, F.; González Gallego, LF.; Murillo López de Silanes, J. (1995). *Fisiología Veterinaria*. McGraw-Hill, Madrid. pp. 969-986.
- Hoffmann, B.; Busges, F.; Engel, E.; Kowalewski, MP.; Papa, P. (2004). "Regulation of corpus luteum-function in the bitch". *Reprod Domest Anim* (39), pp. 232–40.
- Hoffmann. B.; Hoveler. R.; Hasan. SH.; and Failing. K. (1992) "Ovarian and pituitary function in dogs after hysterectomy". *J Reprod. Fert.* 96, pp. 837-845.
- Holst, PA.; Phemister, RD. (1974). "Onset of diestrus in the beagle bitch: definition and significance". *Am. J Vet Res* (35), pp.401–6.
- Illanes, J.; Orellana, C.; Fertilio, B.; Leyton, V.; Venegas, F. (2007). "Análisis Macroscópico y Microscópico del desarrollo embrionario y fetal en el gato (*Felis catus*), en relación con el desarrollo de la vesícula coriónica y de la placenta". *Int J Morphol.* 25(3) pp. 467-481.
- Jemmett, JE.; Evans, JM. (1977). "A survey of sexual behaviour and reproduction of female cats". *J Small Anim Pract.* (18) pp. 31-37.
- Johnson, CA. (2008). "Pregnancy management in the bitch". *Theriogenology* (70), pp. 1412–1417.
- Johnston, SD.; Root Kustritz, MV.; Olson, PNS. (2001). "The queen". En: Johnston, SD.; Root Kustritz, MV.; Olson, PNS. *Canine and feline theriogenology*. (pp. 389-495). Philadelphia, London, New York, St. Louis, Sydney, Toronto: W.B. Saunders Company.
- Johnston, SD., Kustritz, MVR.; Olson, P. (2001). "Canine pregnancy". "En" *Canine and feline Theriogenology*, Ed. (pp. 66-104). Philadelphia: WB Saunders.
- Kelley, R. (2002). "Canine reproductive management: factors affecting litter size". In: *Proceedings of the Annual Conference of the Society for Theriogenology and American College of Theriogenology*. pp. 291–301.
- Knospe C. (2002): "Periods and Stages of the Prenatal Development of the Domestic Cat". *Anat. Histol. Embryol.* (31) pp. 37-51.
- Kowalewski, MP.; Ihle, S.; Siemieniuch, MJ.; Gram, A.; Boos, A.; Zdunczyk, S.; Fingerhut, J.; Hoffmann, B.; Schuler, G.; Jurczak, A.; Domosławska, A.; Janowski, T. (2015). "Formation of the early canine CL and the role of PGE2 in regulation of its function: an in vivo approach". *Theriogenology* doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.12.006.
- Kustritz, MV. (2005). "Pregnancy diagnosis and abnormalities of pregnancy in the dog". *Theriogenology*. (64), pp. 755–765.
- Lee, WM.; Kooistra, HS.; Mol, JA.; Dieleman, SJ.; Schaefers-Okkens, AC. (2006). "Ovariectomy during the luteal phase influences secretion of prolactin, growth hormone, and insulin-like growth factor-I in the bitch". *Theriogenology* (66), pp. 484–490.

- Malassiné, A.; Ferré, F. (1979). "Delta 5,3 β Hidroxyteroid Dehydrogenase Activity in Cat Placental Labyrinth: Evolution during Pregnancy, Subcellular Distribution". *Biol. Reprod.* (21) pp. 965-971.
- McGeady, TA.; Quinn, PJ., Fitzpatrick, ES., Ryan, MT. (2006). "Gastrulation". En: *Veterinary embryology*. Blackwell Publishing Ltd.; pp. 34-41.
- Munday, HS.; Davidson, HPB. (1993). "Normal gestation lengths in the domestic shorthair cat (*felis domesticus*)". *J Reprod Fertil.* pp. 47: 559.
- Nelson, RW.; Couto, G. (2000). "*Medicina interna de los animales domésticos*". 2da. Edición. (p. 936-953). Buenos Aires, Argentina. Ed. Inter-Médica.
- Nyland, TG.; Mattoon, JS. (2002). "*Ovarios y útero*". En: Nyland, TG.; Mattoon, JS. *Diagnóstico ecográfico en pequeños animales*. 2da. Edición. (pp. 240-259). Barcelona, España. Ed. W.B.S. Company.
- Okkens, AC.; Dieleman, SJ.; Bevers, MM.; Lubberink, AAME.; Willemse, AH. (1986). "Influence of hypophysectomy on the lifespan of the corpus luteum in the cyclic dog". *J Reprod. Fert.* (77). pp. 187-192.
- Onclin, K.; Murphy, B.; Verstegen, J. P. (2002). "Comparisons of estradiol, LH and FSH patterns in pregnant and nonpregnant beagle bitches". *Theriogenology* (57), pp. 1957-1972.
- Polisca, A.; Scotti, L.; Orlandi, R.; Brecchia, G.; Maranesi, M.; Zerani, M.; Boiti, C. (2010). "Aglepristone (RU534) administration to non- pregnant bitches in the mid- luteal phase induces early luteal regression". *Theriogenology.* (74), pp. 672-681.
- Prescott, CW. (1973). "Reproduction, patterns in the domestic cat". *Aust Vet J.* (49) pp. 126-127.
- Pretzer, SD. (2008). "Canine embryonic and fetal development: A review". *Theriogenology.* (70), pp. 300-303.
- Rott, MV.; Johnston, SD.; Olson, PN. (1995). "Estrous length, pregnancy rate gestation and parturition lengths, litter size and juvenile mortality in the domestic cat". *J Am Anim Hosp Assoc.* (31) pp. 429-433.
- Schmidt, PM.; Chakraborty, PK.; Wildt, DE. (1983). "Ovarian activity, circulating hormones and sexual behavior in the cat. II. Relationships during pregnancy, parturition, lactation and the postpartum estrus". *Biol Reprod.* (28) pp. 657-671.
- Senger, PL. (2003). "Embryogenesis of the pituitary gland and the male or female reproductive system". "En": *Pathways to pregnancy and parturition*. Current Conceptions Inc. pp. 80-101.
- Senger, PL. (2003). "*Placentation, the endocrinology of gestation and parturition*". En: Senger PL *Pathways to pregnancy and parturition*. 2nd Edition. (pp. 304-325). Washington, USA. Current Conception, INC.
- Siemieniuch, MJ.; Jursza, E.; Szostek, AZ.; Skarzynski, DJ.; Boos, A.; Kowalewski, MP. (2012). "Steroidogenic capacity of the placenta as a supplemental source of progesterone during pregnancy in domestic cats". *Reprod Biol Endocrinol.* (10) pp. 89.

- Swanson, WF.; Roth, TL.; Wildt, DE. (1994). "In Vivo Embryogenesis, Embryo Migration, and Embryonic Mortality in the Domestic Cat". *Biol Reprod.* (51) pp. 452-464
- Tsutsui, T.; Amano, T.; Shimizu, T.; Murao, I.; Stabenfeldt, GH. (1989). "Evidence for transuterine migration of embryos in the domestic cat". *Jap. J. Vet. Sci.* (51) pp. 613-617.
- Tsutsui, T.; Kirihaara, N.; Hori, T.; Concannon, P W. (2007). "Plasma progesterone and prolactin concentrations in overtly pseudopregnant bitches: a clinical study". *Theriogenology.* (67), pp. 1032–1038.
- Verstegen, JP. (1998). "*Physiology and endocrinology of reproduction in female cats*". En: Simpson GM, England GCW, Harvey M, editores. *Manual of small animal reproduction and neonatology.* (pp. 11-16). United Kingdom, British Association.
- Verstegen, J.; Onclin, K. (2008). "Endocrinology of pregnancy in the dog: A review". *Theriogenology* (70), pp 291–299.
- Wimsatt, WA. (1975). "Some comparative aspects of implantation". *Biol Reprod.* (12), pp.1–40.
- Yeager, AE., Mohammed, HO.; Meyers-Wallen, V.; Vannerson, L.; Concannon, PW. (1992). "Ultrasonographic appearance of the uterus, placenta, fetus, and fetal membranes throughout accurately timed pregnancy in beagles". *Am J Vet Res.* (53), pp.342–51.
- Yeager, AE.; Concannon, PW. (1995). "Ultrasonography of the reproductive tract of the female dog and cat". "In": Bonagura JD, Kirk RW, editors. *Kirk's current veterinary therapy.* WB Saunders Co. pp. 1040–52.
- Zambelli, D.; Prati, F. (2006). "Ultrasonography for pregnancy diagnosis and evaluation in queens". *Theriogenology.* 66(1) pp. 135-44.

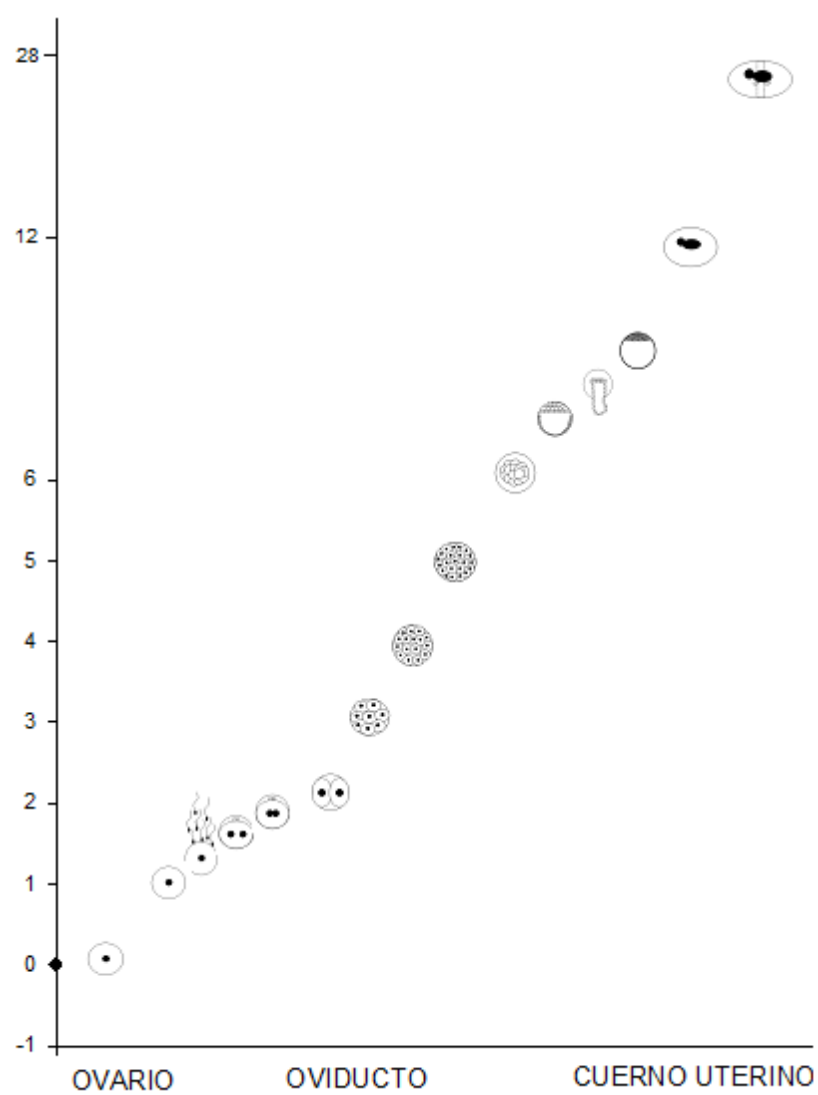


Figura 1. Diagrama del desarrollo embrionario – fetal en la gata doméstica



Foto 1: Bulldog Francés, gestación a término

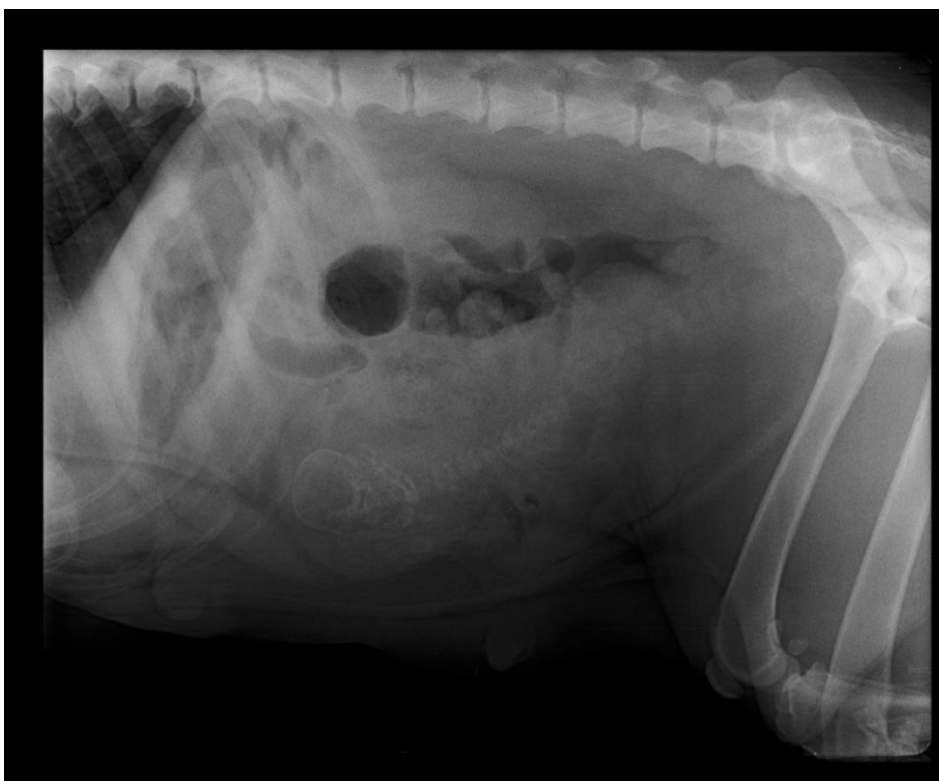


Foto 4: Rx en perra preñada de 55 días de gestación. Presencia de feto único

CAPÍTULO 11

Parto eutócico y distócico

María Alejandra Stornelli

El conocimiento de la fisiología del parto normal (eutócico), resulta indispensable para la detección de un parto anormal y el diseño de estrategias de manejo de un parto distócico. La fisiología del parto es menos conocida en la perra y en la gata, que en las especies de producción, en las cuales se han realizado numerosos estudios sobre los mecanismos del parto (Senger 2003). Determinar la fecha probable de parto (FPP) es uno de los puntos básicos para el manejo racional del mismo y la obtención de un alto porcentaje de cachorros vivos y sanos al nacimiento (Stornelli y col. 2001, Stornelli y col., 2006, Lamm y Makloski 2012).

En la perra el estudio citológico vaginal es un método complementario, sencillo, poco invasivo y de bajo costo que nos permite estimar en forma eficiente la FPP. Se ha comprobado que el parto ocurrirá 56 a 58 días después del primer día del diestro. El día 54 los fetos están maduros y aptos para el nacimiento pero si el parto ocurre el día 53 estaremos en presencia de un parto prematuro. La gestación puede alargarse hasta el día 60 después del PDD, pero el día 61 estaremos en presencia de una gestación prolongada (Jhonston y col 2001, Ettinger 2006, Michel y col. 2001, Sporri y col. 2011). Estos datos son sumamente importantes a la hora de tomar decisiones sobre cuando realizar una cesárea o cuando es necesario implementar un protocolo farmacológico para continuar o interrumpir, según sea el caso, la gestación.

Parto eutócico

Endocrinología del parto

El evento inicial que desencadena el parto, al igual que ocurre en otras especies, es la secreción de cortisol fetal. La maduración del eje Hipotálamo - Hipófisiario - Adrenal resulta indispensable para iniciar la liberación de glucocorticoides. Al final de la gestación el feto sufre estrés debido a que el aporte nutricional y de oxígeno realizado por la placenta ya no es suficiente. Así mismo, el espacio disponible en el útero al final de la gestación sería insuficiente e influiría sobre el estrés fetal (Brogniat y col. 1983, Concannon y col. 1989, Van der Weyden y col. 1989, Jhonston y col. 2001). El estrés fetal es el responsable de la liberación de ACTH hipotalámica que estimula a la glándula adrenal provocando la liberación de cortisol fetal. El cortisol no solo es necesario para que desencadene el parto sino también esencial para la producción del surfactante pulmonar, sin el cual la vida extrauterina sería imposible. Así mismo el cortisol hace posible la elevación de la glucemia posnatal, hecho que favorece la supervivencia neonatal (Van der Weyden y col. 1989, Jhonston y col. 2001).

Las concentraciones séricas de cortisol durante la semana previa al parto se encuentran dentro del rango normal (23 ± 1 ng/ml) elevándose el día previo al parto (63 ± 7 ng/ml) y disminuyendo (20 ± 4 ng/ml) en el momento del parto. Este aumento en la concentración plasmática de glucocorticoides en la madre reflejaría la liberación de corticoides fetales (Concannon y col. 1989). El cortisol fetal promueve la síntesis de enzimas que convierten la progesterona en estradiol, y la síntesis de prostaglandina $F2\alpha$ ($PF2\alpha$) en la placenta (Senger 2003). La $PF2\alpha$ es la responsable de la lisis del cuerpo lúteo con el consecuente descenso abrupto de la progesterona sérica a concentraciones basales ($\leq 0,5$ ng/ml), evento que causa la liberación del bloqueo uterino producido por la progesterona. Como se ha discutido en la sección de gestación, en la perra el cuerpo lúteo es la única fuente de progesterona mientras que en la gata la progesterona placentaria permitiría mantener la gestación al final de la misma. Es así que en la gata la producción de estrógenos a partir de la progesterona promovida por los corticoides fetales sería un evento fundamental en la disminución de progesterona y liberación del bloqueo uterino. La contractilidad del miometrio iniciada por los estrógenos y la $PF2\alpha$ promueve la liberación de oxitocina por parte del hipotálamo (reflejo de Ferguson, Gráfico 1). La oxitocina liberada al torrente circulatorio aumenta la liberación de $PF2\alpha$ y contribuye con la contractilidad uterina permitiendo la expulsión fetal. Los mencionados eventos endocrinológicos

hacen posible la contractilidad del miometrio que causará la dilatación del cuello uterino y la expulsión fetal en la gata y en la perra (Concannon y col. 1989, Jhonston y col 2001, Senger 2003).

Las concentraciones séricas de prolactina aumentan al final de la gestación alcanzando máximas concentraciones poco antes del parto. La relaxina juega un papel importante relajando los ligamentos pélvicos y el canal del parto.

Estadios del parto

El parto en la gata y en la perra presenta 3 estadios: el estadio I o fase de dilatación, el estadio II o fase de expulsión y el estadio III o fase de descanso y expulsión de la placenta. En las mencionadas especies ocurre una sola fase de dilatación y tantas fases de expulsión y descanso como fetos gestados existan (Feldman y Nelson 2004).

Estadio I (fase de dilatación)

La hembra presenta algunos signos relacionados con la fase de dilatación: intranquilidad, anorexia (12 a 24 hs previas a la expulsión aunque a veces este signo no aparece), vómitos, temblores, la perra en este momento puede mirarse los flancos y manifestar la conducta de hacer nido mientras que la gata puede ronronear continuamente. Si bien en esta fase ocurren contracciones uterinas no es posible observar la ocurrencia de las mismas al inspeccionar al animal. La actitud del animal respecto al propietario puede variar, mientras algunas hembras prefieren estar con el propietario, otras buscan un lugar apartado para parir. En esta fase puede identificarse el descenso de temperatura entre 0,8 y 1°C. Este descenso térmico ocurre 12 a 14 hs luego del descenso de la progesterona. La expulsión de los fetos ocurrirá en las 24 hs subsiguientes al descenso de la temperatura (Ettinger y 2006). Es importante reconocer los signos de la fase de dilatación para poder identificar el inicio de la misma. Esta fase dura de 6 a 12 horas, pudiendo prolongarse hasta 24 hs. Algunas veces se puede observar la pérdida vaginal de un fluido transparente al inicio de esta fase (Jhonston y col. 2001, Feldman y Nelson 2004).

La fase de dilatación inicia con el comienzo de las contracciones que se hacen cada vez más frecuentes e intensas. La ocurrencia de contracciones uterinas eleva la presión intrauterina estimulando el reflejo de Ferguson e impulsando la dilatación del cérvix. Al final de esta fase el feto extiende cabeza, cuello y miembros, las membranas fetales se introducen en el cérvix coadyuvando con la dilatación del mismo y estimulando el reflejo de Ferguson. La dilatación

cervical completa marca el fin de esta fase y el comienzo de la fase siguiente (Van der Weyden y col. 1989, Wheaton y col. 1986, Jhonston y col. 2001, Feldman y Nelson 2004, Ettinger 2006)

Estadio II (fase de expulsión)

Los fetos penetran y atraviesan el cérvix estimulando el reflejo de Ferguson que promueve la liberación de oxitocina mediante lo cual se intensifican las contracciones uterinas que se acompañan en esta fase con contracciones de los músculos abdominales. Es así que las contracciones en esta fase pueden observarse desde el exterior a través de los pujos que realiza la hembra.

Al aproximarse el feto a la pelvis la capa más externa de las membranas fetales, el alantocorión, alcanza la vulva pudiendo romperse espontáneamente, si esto no ocurre la madre lo rompe al morderla eliminandose líquido hacia el exterior. El amnios penetra en la vagina conteniendo gran cantidad de fluido lo que contribuye a dilatarla. En este momento el feto se encuentra extendido en el canal del parto lo cual facilita la expulsión. Cuando la cabeza de un feto, en presentación anterior, penetra totalmente en el canal del parto, la presión que ejerce desencadena el reflejo de Ferguson que determina la aparición de contracciones voluntarias de la prensa abdominal que ayudan a progresar la cabeza y hombros a través de la pelvis, una vez éstos alcanzan el exterior el resto del feto se expulsa fácilmente (Foto 1). La madre, en el momento en que la cabeza del feto asoma por la vulva, rompe el amnios mordisqueándolo, y lame al cachorro liberándolo de las envolturas. Luego la hembra corta el cordón umbilical mordiéndolo. La expulsión de cada cachorro, una vez que este atraviesa el cuello uterino, debe ser rápida para evitar sufrimiento fetal. El tiempo ideal de expulsión no debería exceder los 30 minutos. El feto puede tener una presentación posterior considerándose normal tanto en la perra como en la gata.

El término posición hace referencia a la orientación del eje longitudinal del feto respecto al canal del parto, pudiendo ser dorsal, ventral o lateral. La postura fetal se refiere a la posición de los miembros y la cabeza, siendo lo normal la completa extensión de la cabeza, estando los miembros anteriores y posteriores completamente extendidos. (Van der Weyden y col. 1989, Wheaton y col. 1986, Jhonston y col. 2001, Senger 2003, Feldman y Nelson 2004, Ettinger 2006)

Estadio III o fase de descanso y expulsión de la placenta

Luego de la expulsión de un cachorro la hembra entra en la fase de descanso en la cual se encuentra tranquila, alimenta a los cachorros, descansa y puede expulsar la o las placentas

(Foto 2). No es necesario que luego de cada cachorro la hembra expulse una placenta, pueden expulsarse 2 o 3 cachorros y luego expulsarse 2 o más placentas. Esta fase puede durar minutos u horas, sin embargo si transcurren 4 a 6 horas y la hembra no ha vuelto a expulsar otro feto debe realizarse un examen y evaluarse la situación para detectar una posible distocia.

La duración del parto varía mucho en función del tamaño de la camada, así mismo se presenta también una gran variabilidad individual. Algunas perras pueden parir dos cachorros con un intervalo de minutos entre ambos nacimientos y terminar de parir en 2 ó 4 horas mientras otras pueden emplear hasta 6, 12 hs o más para expulsar toda camada. La expulsión de toda la camada suele ser de menor duración en la gata que en la perra, el intervalo entre el nacimiento de dos crías suele ser más corto, completándose con frecuencia el parto en 2 ó 3 horas a partir del nacimiento del primer gatito (Feldman y Nelson 2004, Ettinger 2006).

Una descarga vulvar de color verde oscuro (debido a la biliverdina) con presencia de sangre acompaña al desprendimiento placentario y a la ocurrencia del parto. Es importante recordar que el aumento de las concentraciones plasmáticas de fibrinógeno, fibronectina y factor van Willebrand durante la gestación interviene en el manejo de la hemorragia del parto (Stornelli y col. 2011). Normalmente, la hembra come la placenta y, en ocasiones, vomita. La ingesta de placentas es un acto fisiológico importante en el reconocimiento materno neonatal con el cual no debe interferirse. Debe permitirse que la hembra ingiera al menos algunas placentas. Es importante no interferir, mediante productos de limpieza perfumados, con las feromonas que aromatizan los productos del parto durante el mismo debido a que las feromonas cumplen un importante rol en el reconocimiento materno neonatal. Enmascarar las feromonas del parto con sustancias perfumadas puede causar problemas en el comportamiento materno y cuidado de las crías por fallas en el reconocimiento materno neonatal (Feldman y Nelson 2004, Jhonston y col. 2001).

El manejo y la atención del parto en caninos y felinos es un desafío para el Médico Veterinario. Podría decirse que no hay dos partos iguales, cada parto es particular y se relaciona con las diferencias raciales, conductuales e individuales de cada hembra. Identificar la ocurrencia de un parto anormal en forma temprana permite tomar decisiones que aumenten la supervivencia peri y neonatal.

Parto distócico

El término distocia significa parto dificultoso. Se considera parto distócico cuando la hembra no puede expulsar a los fetos sin ayuda externa. Es así que si las fases del parto no transcurren en la forma y el tiempo adecuados puede estar ocurriendo una distocia (Pretzer 2008). Hay una serie de signos que nos indican que la hembra puede estar presentando una distocia. Estos signos son: contracciones fuertes (pujos) sin expulsión, vocalización y quejidos mientras lame u observa el periné, interrupción del parto, descenso de la temperatura sin inicio del parto, no ocurrencia del parto mas allá de la fecha probable de parto. (Jhonston y col. 2001, Pretzer 2008).

Clasificación de las distocias

Distocia obstructiva

En este tipo de distocia acontecen contracciones uterinas acompañadas de fuertes contracciones de los músculos abdominales (pujos) sin ocurrencia de expulsión. La distocia obstructiva puede ocurrir por causas maternas (canal de parto demasiado pequeño para expulsar al feto) o por causas fetales (feto demasiado grande para ser expulsado). Algunos ejemplos de distocia obstructiva son: fracturas del canal pélvico que reducen su diámetro, desproporción cefalopélvica (pelvis estrecha torax ancho) situación que ocurre en los perros Bulldog o gatos persas, alteraciones fetales como anasarca fetal (foto 3) o malformaciones fetales como meningocele que aumentan el tamaño fetal, cachorros de alto peso al nacimiento de origen genético o asociado a enfermedades como diabetes Mellitus (Jhonston y col. 2001, Feldman y Nelson 2004, Ettinger 2006).

Inercia uterina primaria

Algunas perras llegan a la fecha probable de parto, desciende la progesterona sérica y la temperatura pero no ocurren contracciones uterinas. Es así que la lisis del cuerpo luteo con descenso de la progesterona y liberación del bloqueo uterino no seguido de contracciones se denomina inercia uterina primaria. Este tipo de distocia ocurre más frecuentemente en perras de talla pequeña (Jhonston y Nelson 2001, Davison 2011, Ettinger 2006).

Inercia uterina secundaria

En ocasiones el parto se desarrolla sin inconvenientes hasta que en un momento el parto se detiene y no ocurren contracciones uterinas ni expulsiones. La inercia uterina secundaria suele ocurrir más frecuentemente en perras que han gestado un gran número de cachorros. Es así que luego de la expulsión de varios cachorros el parto se interrumpe. Algunas perras pueden retomar el parto 24 o 36 hs más tarde, sin embargo no es posible determinar cuándo el parto va a continuar y cuándo no. Este hecho hace que sea muy riesgoso esperar un día o más para ver si el parto se inicia nuevamente ya que pueden morir los fetos dentro del útero poniendo y ponerse en riesgo la vida de la madre (Concannon y col. 1989, Jhonston y col. 2001, Senger 2003).

Falla en la iniciación del parto

En algunas ocasiones la gestación llega a término pero el parto no inicia, no hay luteolisis ni descenso de progesterona. Esto ocurre cuando el feto está muerto por lo que no puede mandar señales hormonales (corticoides asociados al estrés fetal) que indiquen que el parto debe iniciar. Otra causa de falla en la iniciación del parto es la presencia de un feto único en una hembra de gran talla que en la que se esperaría una gestación de gran número de cachorros. En este caso las señales enviadas por el feto no son suficientes para la iniciación del parto (Jhonston y col. 2001, Feldman y Nelson 2004, Ettinger 2006).

Es importante destacar que los controles gestacionales de la hembra permiten disminuir la ocurrencia de distocias. La raza, edad, estado de salud y datos del semental permiten determinar si el riesgo de distocia es bajo, moderado o alto (Stornelli y col. 2011). La determinación del riesgo de distocia permite realizar un parto controlado o una cesárea programada según sea el caso (Stornelli y col. 2001, Lamm y Makloski 2012).

Antes de implementar un tratamiento médico siempre debe descartarse la ocurrencia de una distocia obstructiva mediante un examen ginecológico detallado y la selección e interpretación de los métodos complementarios adecuados según el caso.

En algunas ocasiones puede ser útil la ayuda obstétrica durante la fase de expulsión. Sin embargo, por cuestiones anatómicas (tamaño y extensión de la vagina canina y felina) este tipo de ayuda es limitado.

El uso de oxitocina y/o prostaglandina está indicado en el caso de ocurrencia de contracciones débiles y suele ser poco efectivo en los casos de inercia uterina primaria o secundaria. El uso de estas drogas está contraindicado en la distocia obstructiva.

En aquellos casos en que el médico veterinario, luego de la evaluación tanto clínica de la hembra como de los métodos complementarios de diagnóstico utilizados, decida implementar un tratamiento médico, el equipo quirúrgico y el quirófano debe estar disponibles ya que muchas veces estos pacientes finalmente deben ser sometidos a cesárea.

Bibliografía

- Brogniart, M.L. (1983). Les Dystocies chez la chienne. Thèse. Alfort.
- Concannon, P.W.; McCann, J.P.; Temple, M. (1989). "Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog". *Reprod. Fert*, 39 (3), pp. 25.
- Concannon, P.W. (1986). Physiology and Endocrinology of Canine Pregnancy. *En*: Morrow, D.A. (Ed.), Current Therapy in Theriogenology, Philadelphia: Saunders.
- Davidson AP. (2011). Primary uterine inertia in four labrador bitches. *J Am Anim Hosp Assoc*. 47(2), pp. 83-8.
- Ettinger S J. (2006). Tratado de Medicina Interna Veterinaria. Elsevier. St Louis. Missouri. USA.
- Feldman E, Nelson R. (2004). Feline reproduction. In canine and feline endocrinology and reproduction, (3st ed). Philadelphia: WB Saunders.
- Johnston S; Root Kustritz M; Olson P. (2001). Canine and Feline Theriogenology. Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- Lamm, C.G.; Makloski, C.L. (2012). Current advances in gestation and parturition in cats and dogs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 42(3), pp. 445-56.
- Michel, E.; Spörri, M.; Ohlerth. S.; Reichler, I. (2011). Prediction of parturition date in the bitch and queen. *Reprod. Domest. Anim*. 46(5), pp. 926-32.
- Pretzer SD. Theriogenology. (2008). Medical management of canine and feline dystocia. *Theriogenology*. 70(3), pp. 332-336.
- Senger PL. (2003). Pathways to pregnancy and parturition. (2ed). USA, Washington: Current conceptions..
- Spörri, M.; Ohlerth, S.; Reichler, I. (2011). Prediction of parturition date in the bitch and queen. *Reprod Domest Anim*. 46(5), pp. 926-932.
- Stornelli, M.C.; Stornelli, M.A. (2001). Manejo anestésico del paciente en gestación y parto canino. *Analecta Veterinaria*. 21(1), pp. 22-30
- Stornelli, M.C.; Savignone, C.A.; Gimenez, F.; Tittarelli, C.M.; de la Sota, R.L.; Stornelli, M.A. (2006). Particularidades del ciclo estral canino. aspectos clínicos y endocrinológicos. *Revista Veterinaria Cuyana*. 1(2), pp. 26-35.
- Stornelli MA. (2011). Mortalidad perinatal. "Controles gestacionales y salud del neonato". *XI Congreso Nacional de AVEACA*. pp. 1-5
- Van der Weyden, G.C.;, Taverne, M.A.M., Dieleman, S.J.; Wurth, Y.; Bevers, M.M.; Van Oord. (1989). Physiological aspects of pregnancy and parturition in dogs. *Reprod. Fert*. 39, pp. 211-224.
- Wheaton, L.G.; Rodríguez Martínez, H.; Weston, P.G.; Heng Ko, C.; Guftafsson, B.K. (1986). Recording uterine motility in the nonanesthetized bitch, *Am.J. Vet. Res*. 47, (10), pp. 2205-2207.

Figura 1: Eventos endocrinológicos del parto

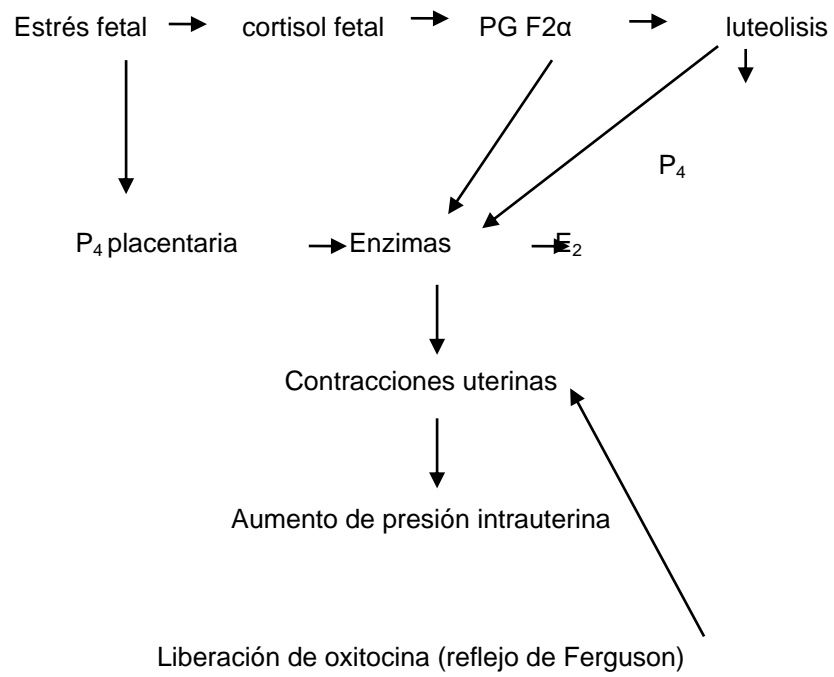




Foto 1: Estadio II: fase de expulsión



Foto 2: Estadio III: fase de reposo



Foto 3: Anasarca fetal en cachoro bulldog (a). Cachorro normal de la misma camada (b).

PARTE III:

Métodos complementarios de diagnóstico

*María Candela Bonaura; María Carla García Mitacek;
Claudia Marcela Tittarelli*



CAPÍTULO 12

Extracción y evaluación seminal en caninos

Claudia Marcela Tittarelli

Introducción

El análisis de semen (espermograma) es un estudio complementario que nos permite conocer la calidad del eyaculado de un reproductor canino. Debe realizarse luego de la exploración clínica tanto general como andrológica del macho para descartar patologías que puedan alterar calidad seminal.

Este análisis debe realizarse previo apareamiento en un servicio natural, para estimar si el semen es de buena calidad o bien, en caso de no poseer la calidad esperada, poder tomar las medidas necesarias para mejorar el estado de ese macho subfétil. También debe evaluarse el semen en caso de utilizarlo en inseminación artificial, tanto con semen fresco como cuando se desea congelar el eyaculado. En casos donde se requiera conservar el semen mediante refrigeración o congelación, debemos realizar este estudio para conocer la calidad inicial del eyaculado ya que luego de este proceso se pierde aproximadamente el 50% de la calidad espermática. Asimismo, ante un diagnóstico presuntivo de infecciones en el tracto reproductivo, el estudio de las fracciones espermáticas caninas por separado nos permitirá confirmar y

localizar la afección, aislar el agente etiológico realizando un cultivo de semen y hacer un tratamiento específico luego de realizado un antibiograma (Dragonetti, 2005).

Colección del semen

Condiciones requeridas

La sala de extracción debe ser un lugar tranquilo y sin distracciones, evitando al máximo la presencia de personas que resulten extrañas para los perros y alteren su actitud. Además, lo ideal es realizar la colección de la muestra seminal, en un lugar cercano a donde se llevará a cabo el procedimiento tanto de evaluación como de procesamiento.

Debemos utilizar guantes de látex para evitar el contacto con el semen de manera de evitar el posible contagio de infecciones zoonóticas (*Brucella canis*). Todo el material que será utilizado deberá ser estéril y mantenerse a 37°C para evitar el daño de los espermatozoides por el shock térmico o shock de frío (Romagnoli, 2002; Thomassen, 2009).

Eyaculado canino

El eyaculado canino presenta variaciones significativas de volumen y concentración espermática debido, principalmente, a las grandes variaciones de tamaño entre los animales y entre las diferentes razas (Carlotto Rondona 2009). El semen canino está constituido por dos componentes, uno celular conformado por los espermatozoides y uno líquido o plasma seminal constituido principalmente por la secreción prostática (única glándula sexual accesoria en el perro).

El semen es eyaculado en tres fracciones bien diferenciadas (Allen 1992).

- La primera fracción es transparente, de aspecto acuoso, proviene de la próstata, su pH oscila entre 6,2 – 6,5 y un volumen de 0,5 a 5ml (Stornelli, 2006), no contiene espermatozoides y su emisión dura de 30 a 50 segundos. Es la de menor volumen en todo el eyaculado, es llamada “fracción pre espermática”. Esta fracción es la que corresponde al momento del cortejo en el servicio natural
- La segunda fracción es ligeramente más viscosa que la anterior, su color varía de blanquecino a marfil, relacionado con la cantidad de espermatozoides que posea. Es blanca, opaca, opalescente y su volumen es intermedio. Su aspecto es más turbio que la primera; proviene del epidídimo y contiene a los espermatozoides; el pH se sitúa entre 6.3 y 6.6. Su emisión tiene una duración de 30 segundos a 4

minutos (Felman y Nelson, 2004). Es la de volumen intermedio, llamada “fracción espermática”. Esta fracción coincide con los movimientos de empuje del servicio natural y, dependiendo del tamaño del perro puede tener un volumen de 0,5 a 5ml (Concannon, 1991).

- La tercera y última fracción proviene de la próstata y es de color transparente, de aspecto acuoso y su pH oscila entre 6.5 y 7. Esta fracción no contiene prácticamente espermatozoides y es la más abundante. Su volumen depende de la duración del abotonamiento, y es directamente proporcional a la actividad secretoria de la glándula prostática. Es de aproximadamente 4 ml pudiendo variar entre 1 a 17 ml (Sorribas, 1999). Su emisión tiene una duración promedio de 3 a 30 minutos. Es la llamada “fracción prostática o post espermática”. Esta fracción post espermática coincide con el desmonte del macho en el servicio natural, y con la etapa de abotonamiento que dura entre 30 y 60 minutos, hasta que perder la ingurgitación el bulbo del pene y tiene como función evitar el reflujo del semen.

Métodos de colección del semen

Ya en 1938 fue inventado el electroeyaculador por Tinte, luego, en 1954 Harrop desarrolla la primera vagina artificial para perros (Hernández, 2007).

Como primer paso y antes de iniciar la colecta, el animal debería ser higienizado en su región abdominal y prepucial con abundante agua. Posteriormente, se debe secar el área con el fin de evitar la contaminación y alteración de la muestra seminal a evaluar y/o preservar.

Existen tres métodos de colección de semen de uso rutinario:

- Electroeyaculación
- Extracción manual sin vagina artificial y mano enguantada
- Extracción manual con vagina artificial

La *electroeyaculación* no es una técnica de elección en el canino, puede utilizarse en animales muy agresivos, tímidos o que no puedan completar el reflejo de erección-eyaculación por extracción manual., requiriendo, además, la anestesia general del animal.

La *toma de muestra manual* con mano enguantada, sin vagina artificial, es la técnica de elección en los caninos. Algunos animales logran rápidamente completar el reflejo de erección-eyaculación y en otros debemos ir entrenando el animal para realizar la maniobra exitosamente, citándolo dos o más veces para su entrenamiento. La colecta seminal puede realizarse estimulando al macho con presencia de una hembra en estro o permitiendo que

el animal huela un trozo de gasa o algodón embebido en secreciones vaginales de una hembra en celo.

Si el animal es mediano o grande la extracción se realizara sobre el piso cuidando que éste no sea resbaladizo. La sujeción debe ser sencilla, el perro y la perra (en caso de tenerla), deben estar con sus dueños. El macho sólo será sostenido de la cabeza por su propietario permitiendo olfatear y/o lamer la región perineal de la hembra en celo si estuviera presente. Como hemos mencionado, se requiere un ambiente tranquilo para el animal, ya que debemos lograr el reflejo de erección – eyaculación sin interrupciones, cualquier ruido, movimiento o situación que distraiga o perturbe al animal podría cortar el reflejo e impedir obtener la muestra de semen (Foto 1). El operador, si es diestro, se acerca al animal por el lado izquierdo y comienza la estimulación con movimientos de fricción del prepucio sobre el pene hacia atrás y hacia delante con la mano derecha. Cuando comienza la ingurgitación, se eliminará la pequeña fracción pre-espermática transparente, en forma de gotas. Esta secreción coincide, la mayoría de las veces, con la protrusión peneana. En este momento se debe correr el prepucio hacia atrás del bulbo del pene de manera que, el orificio prepucial quede por detrás de él para evitar posteriores efectos de compresión-dolor del bulbo ingurgitado sobre el prepucio lo que interrumpirá el reflejo de erección y eyaculación. Seguidamente se ubican los dedos índice y pulgar detrás del bulbo, realizando presión constante o alternada sobre el pene, semejando de esta forma las contracciones vaginales de la hembra (Felman y Nelson, 2004).

Un estímulo adicional para obtener una eyaculación completa puede lograrse rozando con el dedo pulgar el orificio uretral externo. En estos momentos y generalmente acompañado de movimientos de empuje más o menos evidentes según el perro, la secreción cambiará de aspecto y color siendo blanca opalescente, lo que nos indicará que estamos ante la eliminación de la fracción espermática rica en espermatozoides. Esta fracción será la que colectaremos en caso de requerir la muestra para un espermograma. Debe recogerse el semen en un frasco estéril, atemperado a 37C, preferiblemente plástico y de boca ancha para evitar la pérdida de muestra y lesiones por fricción del pene o glande durante la recolección.

Luego de la eyaculación de la fracción espermática el animal comenzará a hacer movimientos intentando levantar la pata trasera a modo de intento de hacer el giro por encima de la perra para lograr la posición de desmonte del servicio natural. En ese momento, el operador rotará el pene 180° en sentido caudal sosteniéndolo desde atrás entre los miembros posteriores del animal simulando la fase de abotonamiento. Aquí, la secreción cambiará y volverá a ser más transparente, indicándonos que comenzó la eliminación de la fase post-espermática o prostática. En caso de requerir sólo la fracción anterior, suspenderemos el estímulo, dejando reposar el animal. El fluido prostático generalmente no se colecta cuando se va a realizar sólo un espermograma de rutina o cuando el semen se desea conservar refrigerado o congelado. Esta fracción aporta poca concentración espermática y sí puede ser utilizada cuando se realizará una inseminación con semen fresco, siempre y cuando sea claro, transparente y no muestre signos de patología. Asimismo, esta última fracción es importante ya

que sirve como medio protector del semen y aumenta su volumen (Romagnoli, 2002). Una vez completada la toma de muestra, se comprueba la des-ingurgitación del pene y su correcta retracción al interior del prepucio para permitir que el propietario se retire con el animal sin que este pueda correr riesgo de lesiones.

La toma de muestra puede realizarse, también, con la *vagina artificial*. Esta es un cono de látex al cual se adosa un tubo colector graduado estéril en lo posible plástico (evita la ruptura) para recoger y medir el volumen del eyaculado. Se comienza la maniobra con una fricción del prepucio sobre el pene y al iniciar la erección peneana se retira el prepucio hacia atrás y se coloca la vagina. Posteriormente, se aplica el estímulo de presión digital suave sobre toda la circunferencia del pene por detrás del bulbo del peneano, de la misma manera que hemos descrito para la extracción manual sin vagina artificial. De esta manera se mantendrá la erección necesaria para la eyaculación. No es la técnica más utilizada en caninos. Tiene la ventaja de coleccionar todo el eyaculado completo hasta el fin de la eyaculación, pero su desventaja consiste en no permitir separar las distintas fracciones del semen. Colectar las fracciones del eyaculado canino separadas nos permite por ejemplo hacer estudios sobre posibles patologías prostáticas como infecciones (prostatitis bacteriana crónica) evaluando la tercer fracción, trabajar con la fracción espermática exclusivamente al realizar un espermograma, etc., Aunque se ha sugerido que la movilidad espermática se ve afectada por los conos de látex, los autores no han identificado este fenómeno como un problema (Felman y Nelson, 2004)

Evaluación seminal

Inmediatamente después de la recolección, y siempre conservando el semen y los materiales a utilizar a 37°C; deben valorarse una serie de características del eyaculado: (Ochoa Torres, 2012)

La evaluación con fines didácticos se divide en:

- Evaluación macroscópica
- Evaluación bioquímica
- Evaluación microscópica

En la práctica, sin embargo, lo primeros parámetros que se evalúan son la motilidad y el vigor debido a que son las variables más sensibles. Si dejamos una gota de semen en un portaobjetos sobre una platina térmica a 37°C, se puede observar como con el paso de los minutos, estos dos parámetros van disminuyendo rápidamente.

Características macroscópicas

- Aspecto

Se evalúa por observación directa. Debe ser opaco y turbio.

- Color

También se aprecia por observación directa. Normalmente es blanquecino, pero esta característica está relacionada con la concentración espermática (Carlotto Rondona, 2009).

Dentro de las alteraciones en la coloración podemos observar coloración amarillenta: la cual indica presencia de orina, siendo este fluido espermicida por sus contenidos ureicos y pH ácido. Coloración rojiza: por presencia de sangre (hemospermia). La sangre puede ser de origen prostático (prostatitis bacterianas, quistes para-prostáticos, hiperplasia prostática benigna), de traumatismos de mucosa peneana, etc. Una vez obtenido el diagnóstico definitivo y llevado a cabo el tratamiento de la patología, se volverá a tomar la muestra de semen para su evaluación. Coloración Verdosa: puede asociarse a presencia de pus, *Pseudomona aeruginosa*, etc. e indica infección en el aparato reproductor. Estos contaminantes alteran el pH y la osmolaridad del eyaculado., alterando la viabilidad celular. En estos casos, se debe descartar el semen, obtener un diagnóstico y realizar un tratamiento antes de la próxima toma de muestra para espermograma. Un color anormal determina la no utilización del semen con fines reproductivos (Stornelli 2000, Stornelli, 2002, Stornelli y de la Sota, 2008,).

- Volumen

Se expresa en mililitros (ml) Este parámetro varía en función de la raza, edad, tamaño y estado fisiológico del individuo, método de recolección y frecuencia de extracción. No es indicador de fertilidad en el macho.

Se obtiene con pipetas plásticas graduadas atemperadas. El volumen total es de 1 a 40ml y la fracción espermática de 0,5 a 5ml (Concannon, 1991).

Evaluación bioquímica

- pH

Su determinación es muy sencilla con las tiras reactivas específicas para tal fin, colocando unas gotas de semen en ellas, estando sostenidas por una pinza.

El pH del semen canino es de 6.5.a 7.2. Este rango depende de la cantidad de líquido prostático colectado ya que el mismo tiene un pH más alcalino. La variación del pH disminuye la motilidad, dato importante al usar diluyentes y sustancias buffer (Alamo Santana, 2007). La variación hacia la alcalinidad puede indicar infecciones bacterianas.

- Marcadores epididimales.

La fosfatasa alcalina es una enzima que en los caninos es producida en el epidídimo, su valor normal en un canino adulto oscila entre 4000 y 5000 U/L. Una concentración baja o su ausencia en el plasma seminal indica una obstrucción bilateral de los epidídimos o los conductos deferentes (Johnston, 1991). Valores superiores no tienen importancia clínica. (Simpson y Harvey, 2000, Stornelli, 2003, Nelson y Couto, 2005).

Características microscópicas

El examen microscópico del semen fresco es suma importancia para juzgar el destino del eyaculado obtenido, es decir su procesamiento para la posterior inseminación artificial o su descarte. Es necesario para esta evaluación que todo el material de vidrio se encuentre a 37° C utilizando el Baño María o las platinas térmicas (pipetas, portaobjetos, cubreobjetos, diluyentes, colorantes, etc.),

- *Motilidad individual*

Este parámetro es utilizado como indicador de la función espermática (Feldman Nelson, 2004). La movilidad es normal cuando el espermatozoide presenta un movimiento progresivo que le permite avanzar con cierta rapidez. Normalmente se desplazan gracias a movimientos de la cola al mismo tiempo que experimentan una rotación alrededor de su eje longitudinal, de tal forma que la progresión final resulta rectilínea. La motilidad será entonces hacia delante, rápida y lineal, y se mide en porcentaje. Para evaluar la motilidad individual se coloca una gota de semen fresco sin diluir entre un portaobjetos y cubreobjetos (atemperados a 37°C sobre una platina térmica) y se observa espermatozoides en varios campos con un microscopio óptico con aumento de 40X. Una movilidad progresiva adecuada en un semen fresco de buena calidad debe ser igual o mayor al 70%, con movimiento rectilíneo y progresivo (Sorribas, 2005). La estimación del porcentaje del movimiento es subjetiva y la aproximación real será dependiente de la experiencia adquirida a lo largo de la práctica de lectura microscópica-

La estimación visual de la motilidad es el método más simple y menos costoso para evaluar la calidad seminal. Sin embargo debe tenerse en cuenta que es el parámetro más influenciado por el operador (Feldman y Nelson 2004). El sistema de análisis computarizado de semen (CASA, Computer assisted semen analysis) combina una cámara termostáticamente controlada (cámara de Makler en la que se deposita una alícuota de semen y se mantiene la temperatura a 37°C durante el examen), un sistema óptico con iluminación de contraste de fases, un detector de imágenes, un conversor digital, un sistema de computación y un monitor de video. Este sistema permite medir el porcentaje de espermatozoides móviles, el porcentaje de

espermatozoides con movilidad progresiva y la velocidad de movimiento. El uso del sistema CASA provee mediciones más objetivas y confiables de la motilidad espermática (Stornelli M, 2009) y permite no sólo evaluar motilidad espermática sino también diferenciar sub-poblaciones en relación al tipo de motilidad espermática (Ej. espermatozoides que muestran movimientos lineales o de hiperactividad). Sin embargo, el sistema CASA es costoso y necesita una exacta calibración (Verstegen, 2002). Si bien, la motilidad es solo uno de los muchos atributos de un espermatozoide fértil, fue el primer atributo utilizado y sigue siendo el más frecuentemente usado como indicador de la función espermática. La motilidad puede alterarse por una inadecuada temperatura como por la presencia de sustancias tóxicas en el equipo de recolección (Alamo Santana, 2007; Ochoa, Lissette Torres. 2012).

- *Vigor*

Es la fuerza o intensidad y tipo de movimiento que realizan los espermatozoides. Se cuantifica en grados en una escala de 0 a 5. Deben ser observados varios campos microscópicos.

0: espermatozoides sin movimiento

1: espermatozoides con movimientos pobres, cabezas fijas, sólo se mueven las colas, pudiendo girar sobre sí mismos

2: espermatozoides con desplazamiento en círculos y algunos progresivos

3: espermatozoides con movimientos progresivos lentos y sinuosos

4: espermatozoides con movimientos progresivos rápidos

5: espermatozoides con movimientos progresivos muy rápidos

Para un semen fresco de buena calidad el vigor debe ser de entre 4 y 5.

- *Morfología*

La morfología espermática es un parámetro indispensable en la evaluación seminal, dado que intrínsecamente está implicada en los problemas de fertilidad tanto en la especie canina como en otras especies.

Características normales de los espermatozoides

La estructura básica del espermatozoide consta de partes claramente diferenciadas

- La cabeza, el cuello y la cola del espermatozoide (que se divide en intermedia, pieza principal, pieza terminal y el axonema. (Muiño, 2009).

Las anormalidades espermáticas caninas se clasificaron como primarias y secundarias (Foto 2). La primarias son aquellas que se generan en la espermatogénesis, durante la formación de la célula, como por ejemplo malformaciones de la cabeza, de la pieza intermedia y del flagelo, cabezas y colas dobles, gota citoplasmática proximal, carencia de acrosoma, defecto de Dag visualizándose una cola enrollada alrededor de la cabeza que involucra la pieza intermedia; y las secundarias aquellas ocurridas durante el trayecto entre los testículos y el epidídimo, durante la maduración o debido a la manipulación del semen. Dentro de ellas

encontramos por ejemplo la persistencia de la gota citoplasmática distal, flagelos doblados y ruptura del acrosoma (Freshman, 2002). Los reproductores caninos deben presentar un 70% de células espermáticas normales en la evaluación seminal. Dentro del 30% de anormalidades totales, las anormalidades primarias no deben superar el 10% y las anormalidades secundarias no deben mayores al 20% (Felman y Nelson). Algunos autores separan las alteraciones que se producen en el momento de recolección del semen, tinciones y mala manipulación de la muestra. A todas éstas las denominan terciarias, mientras que otros autores las incluyen dentro de las secundarias. (Alamo Santana, 2007).

Otras clasificaciones posibles son:

- Mayores y Menores: según su asociación con la infertilidad. (Bloom en 1977)

- Compensables y No Compensables (1994 Saacke y col.) según la capacidad del espermatozoide de llegar o no a fertilizar al ovocito. Sin embargo, en los caninos, las anormalidades no están identificadas según estas variables

En la actualidad, quizás lo más adecuado sea identificar cada una de las anormalidades por su ubicación dentro de la estructura del espermatozoide y la relación de cada una de ellas con la fertilidad, para lo cual aún se requieren muchos estudios en el perro.

Existe una alta correlación entre los defectos espermáticos, motilidad e infertilidad (Batista-Arteaga, 2006). El uso de colorantes es importante para visualizarlos (Ochoa, Lissette Torres, 2012). Una de las tinciones utilizada con frecuencia para valorar la morfología de los espermatozoides caninos, es la Tinción 15.

Se coloca una gota de semen fresco atemperado en un portaobjetos, se extiende el preparado, dejándolo secar. Se sumerge en el fijador (metanol) de entre 3 y 5 minutos. Luego en el en la solución I (3 y 5 minutos) y por último en la solución II. Se lava con agua de la canilla. Se deja secar la muestra para evaluar la morfología mediante la observación con objetivo de 40x. Deben observarse un total de 100 células para estimar el porcentaje de células normales y anormales. Las anomalías espermáticas que con mayor frecuencia suelen aparecer en el espermograma canino incluyen la presencia de gotas citoplasmáticas proximales, distales, colas enrolladas y las colas en látigo.

- *Concentración*

La concentración de un eyaculado se puede determinar por medio de un hemocitómetro o por espectrofotometría. En la práctica los conteos se hacen a través de las cámaras cuentaglobulos y en el caso de pequeños animales la Neubauer es la de elección.

La concentración seminal se realiza de la siguiente manera:

Se mezcla 10µL de semen en 2 ml de solución salina formolada logrando una dilución (1:200). Se homogeneiza la muestra y luego se carga con micropipeta por capilaridad la cámara de Neubauer para observarla al microscopio a 40x.

Conteo: Se cuentan cabezas de espermatozoides en el retículo central. De este retículo se cuentan los 4 cuadrados medianos de los extremos y el central. Para evitar contar dos veces la misma célula se establecen previamente las líneas a contar, por ejemplo superior y derecha esto sirve en el caso de que alguna de las cabezas esté tocando una de las líneas. Así se cuentan todas las cabezas del cuadrado mediano y por lo tanto de todos los cuadraditos chiquitos de su interior, siguiendo el sentido de las agujas del reloj. De esta manera, si contamos en total 8 células, una manera práctica de sacar la concentración de ese semen es agregarle un cero y así tendremos los millones de espermatozoides por mililitro, en nuestro ejemplo la concentración será de 80 millones de espermatozoides por mililitro: $(80 \times 10^6 / \text{ml})$.

La fórmula detallada para calcular la concentración (C) es la siguiente:

$$C = \frac{\text{N}^\circ \text{ espermatozoides} \times 400 \times 10 \times 200}{80}$$

Donde

N°= espermatozoides contados (8)

400: total de cuadraditos del retículo

10: corrección altura de la cámara

200: corrección dilución

80: número de cuadraditos contados

Resultado cantidad de espermatozoides por ml =80

En el espermograma canino se requiere evaluar la concentración de células espermáticas por volumen de semen, para obtener la cantidad total de células por eyaculado. Esto se obtiene multiplicando la concentración por el volumen que el animal eyaculó, así, si eyaculó 3 ml, el cálculo sería:

$$3\text{ml} \times 80 = 240 \times 10^6 \text{ espermatozoides totales}$$

En el perro la cantidad de espermatozoides totales debe ser igual o superior a $150 - 200 \times 10^6$, considerándose normal para un perro de tamaño chico o mediano, esperando más cantidad de espermatozoides en un canino de raza grande o gigante.

Entre las causas de una baja concentración espermática, se podrían mencionar:

- Eyaculación incompleta por nerviosismo en machos jóvenes e inexpertos.
- Perros tratados con corticoides o con Ketoconazol que inhiben la espermatogénesis transitoriamente.
- Alteraciones hormonales como el hipotiroidismo
- Estructuras testiculares fibrosadas, por traumatismos o infecciones.

- Cualquier tipo de alteración a nivel escrotal e inflamaciones agudas como orquitis o epididimitis agudas (aumento de temperatura local).
- Anomalías testiculares: criptorquidia unilateral, tumores de células de Sertoli, seminomas, tumor de células intersticiales, degeneración testicular, etc. (Alamo Santana, 2007)

- **Vivos**

La integridad y funcionalidad de la membrana plasmática son esenciales para la conservación de la capacidad fertilizante del espermatozoide. Existen varias metodologías que pueden utilizarse para estudiar la viabilidad espermática e integridad de membrana. Los colorantes vitales, permiten diferenciar espermatozoides vivos de espermatozoides muertos en relación a la permeabilidad de la membrana al permitir el paso o no de los mismos. Células cuya membrana plasmática es funcional y por lo tanto conservan la permeabilidad selectiva, no permiten el paso del colorante y se observan no teñidas. Por el contrario, cuando la membrana plasmática está alterada y pierde la permeabilidad selectiva, permite el paso del colorante y la célula se observa teñida (Watson 1990). Pueden utilizarse colorantes vitales tales como eosina/nigrosina o eosina/azul de anilina (Foto 3). Este último es uno de los más utilizados en todas las especies domésticas debido a que es un método simple y económico. Esta técnica tiñe de color rosado aquellos espermatozoides que presentan una membrana alterada mientras que los espermatozoides vivos se observan de color blanco sobre un fondo púrpura.

En un portaobjetos sobre una platina térmica se mezcla de forma homogénea una gota de semen y una de colorante durante unos 30 segundos (10µ de cada uno aproximadamente) y con otro portaobjetos se realiza el extendido. Se deja secar y luego se observa al microscopio óptico con objetivo de inmersión. Para estimar el número de células vivas y muertas deben contarse 100 células espermáticas por lo que el resultado se expresa en porcentaje.

Actualmente se utilizan tinciones fluorescentes, las cuales presentan una mejor precisión en el estudio de la membrana espermática, entre ellas se puede mencionar la tinción combinada de diacetato de carboxifluoresceína- yoduro de propídeo (DAPI-YP), Estas tinciones permiten visualizar, a través de un microscopio de fluorescencia, los espermatozoides funcionales de color verde, mientras que los espermatozoides muertos, se observan de color rojo (Harrison y Vickers, 1990). Esta técnica nos brinda una evaluación exacta y objetiva de la célula espermática pero el alto costo de los colorantes y equipo necesario impide su uso en muchos laboratorios de práctica diaria (Foto 5).

Se considera que un semen fresco de buena calidad debe tener no menos un 70% de espermatozoides vivos.

- HOST: Test hipoosmótico (Hypoosmotic Swelling Test, HOST) también llamada prueba de endósmosis positiva, es sencilla y poco costosa. Evalúa la funcionalidad e integridad de la membrana de los espermatozoides. Se someten los mismos a un medio hiposmótico, esto causa entrada de agua al espermatozoide para equilibrar la

presión osmótica celular con la del medio. La entrada de agua provoca en la célula un hinchamiento, y al ser una célula con escaso citoplasma responde con enrollamiento de la cola (cola enrollada), mientras que las células con la membrana dañada no experimentan cambios en la cola (cola lisa o estirada). Esta prueba evalúa la integridad funcional de la membrana espermática (Foto 4).

El HOST ha sido adaptado para evaluar espermatozoides de varias especies domésticas incluyendo el perro, en donde se encontró que el hinchamiento hipoosmótico estaba relacionado directamente con la movilidad espermática (Rodríguez-Gil, 1994; Hideki, 1993).

Se colocan 50 µl de semen en 450 µl de solución hiposmótica, se incuba a 37°C en baño maría y luego se lee, colocando una gota de la dilución entre porta y cubreobjetos y observando con objetivo de inmersión. Se cuentan 100 células tomando como positivo cualquier grado de enrollamiento. Un semen fresco de buena calidad debe tener al menos un 70% de colas enrolladas.

- *Integridad acrosomal*

El acrosoma debe estar intacto en el momento de la inseminación o servicio debido que la reacción acrosómica debe ocurrir en el sitio donde ocurra la fertilización.

La morfología acrosómica puede ser observada mediante microscopio de contraste de fase, microscopio electrónico de transmisión y con sustancias fluorescentes (Harrison y Vickers, 1990). Dentro de las lectinas marcadas con fluorescentes, el *Pisum sativum* (PSA) conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) es el más usado para detectar cambios acrosomales mediante el uso de pruebas fluorescentes (Kawakami, 1993; Mendoza, 1992). El PSA se une en forma selectiva a las proteínas acrosomales de los espermatozoides de los mamíferos permitiendo visualizar la integridad acrosómica a través de su conjugación con el FITC (Foto 6).

El semen fresco debe poseer no menos un 70% de acrosomas intactos.

Alteraciones en el eyaculado

1) Aspermia

Ausencia de eyaculado, puede deberse a:

- Obstrucción ductal bilateral
- Eyaculación retrógrada
- Falta en la eyaculación (interrupción del reflejo, mala técnica, ambiente inapropiado o necesidad de adiestramiento del animal para la maniobra de extracción de semen)
- Déficit neurológico o de libido

Debe realizarse un nuevo intento de recolección de semen al menos 6 horas más tarde (Serrano, 2009).

2) Azoospermia

Es la ausencia de espermatozoides en el eyaculado, debida a que:

- Los testículos no están produciendo espermatozoides
- Los espermatozoides se producen pero hay una obstrucción en el epidídimo
- Obtención de un eyaculado incompleto (Serrano, 2009).
- Degeneración testicular bilateral (Sánchez y Pradenas, 2002).
- Atrofia testicular (Villarroel, 2004)
- Fibrosis testicular bilateral (Villarroel, 2004)

3) Leucospermia

Leucocitos en el eyaculado. Puede asociarse a infecciones bacterianas de la próstata, testículo ó epidídimo (Serrano, 2009).

4) Teratospermia

Cuando hay un elevado porcentaje de anomalías morfológicas. Los perros normales deberían tener un 70% o más de espermatozoides morfológicamente normales. Puede ser causada por afecciones patológicas como tumores testiculares, orquitis, fiebre, prostatitis, etc. O bien, por alta frecuencia de servicios realizados o toma de muestras repetidas en cortos periodos de tiempo, obteniendo un eyaculado con gran cantidad de espermatozoides maduros (Serrano, 2009)

5) Astenospermia

Es la ausencia de motilidad espermática. Causada por un equipo de recolección contaminado, exposición de la muestra a temperaturas distintas a 37°C, Síndrome de Kartagener (síndrome de cilio inmóvil) y problemas testiculares (Serrano, 2009).

6) Necropermia

Todos los espermatozoides del eyaculado están muertos. Puede revertirse en algunas causas infecciosas o si la muestra fue sometida a estrés térmico. En etiologías hormono-dependientes, puede ser posible revertirla (Serrano, 2009).

7) Oligospermia

Se presenta cuando hay muy pocos espermatozoides en el eyaculado. Un recuento espermático menor a 200 millones de espermatozoides/eyaculado en perros que pesan más de 4,5 Kg. se considera anormal (Serrano, 2009).

- Puede ocurrir oligospermia estacional en verano por estrés térmico.
- Fiebre

- Hipoplasia testicular (Acland, 1998).
- Degeneración testicular (Sánchez y Pradenas, 2002).
- Orquitis: *Brucella canis*. Distemper, inflamación de las vías urinarias (Cotran y col., 1995)

8) Hematospermia

La presencia de sangre en el eyaculado, por hipertrofia prostática benigna, quistes para-prostáticos en comunicación con la uretra, prostatitis bacterianas, tumores, o debido a un traumatismo durante la recolección o la cópula (Ochoa Lissette Torres, 2012).

9) Aglutinación espermática

Los espermatozoides se ven aglutinados, unidos en grupos lo que ocasiona alteración de su motilidad. Puede observarse en perros afectados por infecciones, crónicas por ejemplo con *Brucella canis* y en orquitis autoinmune (Serrano, 2009).

Factores que influyen sobre las características seminales

- Temperatura

El espermatozoide es una célula altamente sensible a cambios de temperatura y la exposición a la luz, el profesional debe extremar sus precauciones para evitar la muerte espermática por un mal manejo de la muestra (Córdova Izquierdo, 2009).

- Individuo-raza

Algunas investigaciones han conseguido demostrar la variación individual de la calidad del eyaculado al pos-descongelado entre caninos de una misma raza (Batista-Arteaga, 2006).

- Estado del medio ambiente

El miedo y el pánico a determinadas situaciones y ambientes impiden que se produzca una erección completa y por consiguiente que se pueda producir la eyaculación.

Los ejemplares excesivamente juguetones o inquietos, suelen presentar una incapacidad para conseguir que se produzca el reflejo de erección-eyaculación (Alamo Santana, 2007).

Un ambiente con varias personas, ruidos, movimientos no ayuda a desencadenar el reflejo. Tampoco una sujeción exagerada del reproductor.

- Edad

La calidad seminal depende de la edad en que el animal comienza la pubertad. Este factor, en caninos, varía con la raza, el tamaño, etc. En un Gran Danés, por ejemplo, puede alcanzarse la pubertad recién a los 2 años, por lo tanto, si tomamos una muestra al año, obtendremos mala calidad seminal

El aumento de la edad está asociado a patologías tales como: HPB, HP quística, quistes prostáticas y atrofia testicular las cuales se presentan con mayor frecuencia en animales de entre 5 y 10 años; así como la orquitis es más frecuente en perros mayores a 10 años ((Villarroel, 2004).

- Frecuencia de extracción

Una recogida seminal diaria produce una reducción de las reservas espermáticas en aproximadamente 7 días y empeora si se realizan dos (Alamo Santana, 2007).

Se ha comprobado que si se logran 2 eyaculados con escaso margen de tiempo entre recogidas, la motilidad total de la muestra es mayor que la motilidad de cada uno de los eyaculados por separado. Si se realizan recogidas de semen cada 2 días, no ocurre una reducción significativa de las reservas espermáticas (Alamo Santana, 2007).

Si no hay servicio ni toma de muestra de semen por períodos largos, puede ocurrir un envejecimiento de las reservas espermáticas, que serán excretadas con el semen o la orina. (Alamo Santana, 2007).

- Eritrocitos

Se presentan comúnmente con frecuencia en el eyaculado de machos mayores a 5 años, proceden de la próstata e indican enfermedad.

Puede deberse a traumas accidentales que ocurren durante la monta natural o la recogida manual y que producen lesiones en el pene o al prepucio.

La presencia de sangre en el semen que va a ser congelado, afecta negativamente a la motilidad y al estado del acrosoma (Alamo Santana, 2007)

Conclusión

Nunca debemos descartar un reproductor ante un solo espermograma de regular o mala calidad, ya que este resultado puede deberse a: ambiente inadecuado para la recolección, eyaculaciones repetidas por previas a la toma de muestra, administración de drogas que suspendan temporalmente la espermatogénesis, fiebre, problemas hormonales etc. Si hay hemospermia se diagnosticará la causa y, por ejemplo, en caso de ser hipertrofia prostática benigna se medicará al animal y se lo citará para una nueva extracción al final del tratamiento.

Las características seminales que poseen mayor relación con la fertilidad son: el número total de espermatozoides en el eyaculado, el porcentaje de motilidad progresiva y el porcentaje de alteraciones morfológicas observadas (Parks y Graham, 1992).

Bibliografía

- Acland, H. (1998) "Reproductive system: male". In: Thomson's Special Veterinary Pathology. Carlton, W., McGavin, M., 2nd ed. St. Louis: Mosby.
- Alamo Santana, D. (2007), Crioconservación y viabilidad espermática en la especie canina: utilización de nitrógeno líquido vs. ultracongelador de -152°C. Tesis doctoral. Universidad de las Palmas de Gran Canarias.
- Allen, E. (1993) "Valoración del Semen" En: *Fertilidad y obstetricia canina*". (Cap. 9). Zaragoza (España): Ed Acribia, SA
- Batista-Arteaga, M., Alamo-Santana, D., González-Valle, F., Rodríguez, N., Cabrera-Martin, F., Gracia-Molina, A. (2006) "Influencia de la técnica de congelación (nitrógeno líquido versus ultracongeladores de - 152 °C) y variación individual sobre la calidad seminal en el Dogo Canario". *Rev. Ele. Clín. Vet*, pp. 6-13.
- Betancur, G., Vásquez Araque, N., Garcia, E. (2009). "Criopreservación de semen canino y su aplicación en la Inseminación artificial". *Revista CES, Medicina Veterinaria y Zootecnia*, (4) N° 2, pp. 119-129.
- Bloom E. (1977). "Sperm morphology with reference to bull infertility". *Actas del First All-India Symp..Anim. Reprod.* (pp. 61-81).India.
- Buriticá, E, Villanueva, C., Hernández, L. (2009) "Como hacer una evaluación espermática en caninos." *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, (2) No. 2, pp.69-72.
- Burns, G. (2013) "Recolección de semen canino". *Revista Médica Veterinaria*, (7) Número 6.
- Carlotto Rondona, R. (2009) Efecto del momento de adición del glicerol durante la curva de enfriamiento sobre la calidad espermática durante el proceso de criopreservación de semen canino Tesis Doctoral. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de medicina veterinaria. E. A. P. De medicina veterinaria Lima-Perú
- Concannon P. W. (1991) "Reproduction in the dog and cat". In *Reproduction in Domestic Animals*, Cap. 16, pp 517–554, (Academic Press, US, California), 4th ed: .Ed Cupps P. T.
- Córdova Izquierdo, A., Ruiz Lang, C., Córdova Jiménez, C., Córdova Jiménez, M., Guerra Liera, J., Rodríguez Denis, B., Salinas, K. (2009). "Estrés oxidativo y antioxidantes en la conservación espermática". *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 3 (1) pp. 01-38.
- Cotran, R., Vinay, K., Robbins, S. (1995). "Aparato Genital Masculino". En: Robbins, S.: *Patología estructural y funcional*. 5ª ed. Nueva York : Interamericana McGraw-Hill.
- Dragonetti, A., Solis, C., Giordano, A. (2005) "Prostatitis en el perro, revisión.". *Analecta Veterinaria*, (25), n° 01.
- Eilts, B.E., Davidson, A.P., Hosgood, G., Paccamonti, D.L., Baker, D.G. (2005) "Factors affecting gestation duration in the bitch". *Theriogenology*, (64) pp.242-251.
- Feldman, E., Nelson R. (2004) *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*, (Capitulo 25, p 732). Elsevier Health Sciences

- Freshman, J.L. (2002) "Semen Collection and evaluation". *Clinical Techniques in Small Animal Practice* (17) 3 pp. 104 – 107.
- Gómez, V. y Migliorisi, A. (2010) *Guía de estudio para Reproducción Animal*. (Apunte de cátedra). La Plata. Cátedra de reproducción animal, FCV, UNLP.
- Gunzel-Apel AR, Terhaer P, Waberski D. (1994) "Hodendimensionen and Ejakulatbeschaffenheit fertiler Rueden unterschiedlicher Kö rpergewichte". *Kleintier –praxis* (39) pp. 483-486.
- Harrison, R.A., Vickers, S.E. (1990) "Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa". *J Reprod Fertil.*, (88) pp. 343-352.
- Harrop, A.E. (1954) "Artificial insemination of a bitch with preserved semen". *Brit Vet J*, (110) pp.424-425.
- Hewitt, D.A., Leahy, R., Sheldon, I.M., England, G.C.W. (2001). "Cryopreservation of epididymal dog sperm". *Anim Reprod Sci* 67 pp. 101-111.
- Hideki, F., Masashi, I., Takasashi, K. (1993) "Correlation between the hipoosmotic swelling test and various sperm function tests". *Int Fertil*, (38) pp.311-315.
- Johnston, G.R., Feeney, D., Rivers, B., Walter, P. (1991) "Diagnostic imaging of the male canine reproductive organs.". *Vet Clin North Am*, (21) pp.553.
- Kawakami, E, Vandevootrt, C.A, Mahi-Brown, C.A, Tollner, T.L., Overstreer, J.W. (1993) "Comparison of fluoreseinated lectin stain with triple staining for evaluating acrosome reaction of dog sperm". *J. Exp. Zool*, (265) pp.599-603.
- Mellisho E, Gallegos A. (2006). "Manual de laboratorio de reproducción animal". Universidad Nacional Agraria La Molina Lima Perú [en línea] Consultado el 8 Mar 2009 en <http://tarwi.lamolina.edu.pe/~emellisho/reproducción/ Pract06.pdf>
- Mendoza, C., Carreras, A., Moos, J., Tsarik, J. (1992). "Distinction between true acrosomal reaction and degenerative acrosome loss by one-step staining method using Pisum sativun agglutinin". *J. Reprod. Fertil*, (95) pp.755-63.
- Morton, D. and Briuce, S. (1989) "Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs." *J. Reprod. Fertil*, (39) pp. 311-316.
- Muiño, R. (2009) "Evaluación de la motilidad y Viabilidad del semen bovino, mediante el uso de sistemas casa y citometría de flujos: identificación de subpoblaciones espermáticas." España: [sede web]. [Consultado el 25 de marzo de 2011]. En: http://dspace.usc.es/bitstream/10347/2406/1/978849750986_content.pdf
- Nelson RW, Couto CG. (2005) *Medicina interna de animales pequeños*. 3rd ed. (pp.960-964), Buenos Aires-Argentina, Intermédica.
- Ochoa A, Torres L. (2012). Criopreservación de semen canino y evaluación de su calidad espermática a través de microscopía directa e inseminación artificial Tesis doctoral. Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias Medicina Veterinaria y Zootecnia. Cuenca Ecuador.

- Parks, J., Graham, J. (1992) "Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes". *Theriogenology*, (38), Issue 2 pp. 209–222.
- Rodriguez-Gil, J.E., Montserrat, A., Rigau, T. (1994) "Effect of hypo-osmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa". *Theriogenology*, (44) pp. 885-900.
- Romagnoli S. (2002) "Canine artificial insemination with fresh, refrigerated and frozen semen". [En línea]. (Proceedings of the Veterinary Sciences Congress). [Consultado: 12 Mar 2009]. Disponible en: <http://horta.0catch.com/congressospcv/18.pdf>
- Saacke, R.G., Nadir, S., Nebel, R.L. (1994). Relationship of semen quality to sperm transport, fertilization and embryo quality in ruminants. *Theriogenology*, (41) pp. 45-50.
- Sánchez A, Rubilar J. (2001) "Obtención de cachorros mediante inseminación artificial con semen canino refrigerado". Primera descripción en Chile. *Arch. Med. Vet*, (33)1 pp.105-110.
- Sánchez, A., Pradenas, M. (2002). "Algunos conceptos sobre morfología y patología del aparato reproductor del perro". *MEVEPA*, (15) pp.14-26.
- Sanchez, J., Rubilar, J., Gatica, R. (2002). "Uso de la prueba hipoosmótica en la evaluación de la fertilidad potencial de semen canino fresco y congelado" *Archivos de Medicina Veterinaria*, (34) 1 pp.131-134.
- Serrano S. (2009). "Parámetros Seminales anormales." [Sede web]. Colombia [Consultado el 02 de agosto de 2010]. Disponible en: www.campusveterinariosenweb.com/file.php/1/moddata/forum/14/34311/parámetros_seminales_anormales.doc
- Simpson, G.M., Harvey, M.J. (2000) *Manual de reproducción y neonatología en pequeños animales*. Madrid-España, Harcourt.: Ediciones S.
- Sorribas, C.A. (2005). *Atlas de reproducción canina*. Buenos Aires-Argentina: Intermédica.
- Sorribas, C.E. (1999) *Reproducción en los animales pequeños*, 2a ed. Buenos: Inter Médica.
- Stornelli M, de la Sota L. (2006). "Fertilidad y supervivencia del semen canino criopreservado" *Analecta Veterinaria*, 25 (2) pp. 29-38.
- Stornelli, M., De la Sota, L. (2008). "Congelación de semen en caninos." [Sede Web]. La Plata: PV ARGOS.com, [En línea] [consultada el 15 de agosto de 2010]. En: <http://argos.portalveterinaria.com/noticia/1500/>
- Stornelli, M.A, Stornelli, M.C. Rodriguez, R.; Brussa, M.; Barbeito; C., Massone, A., Arauz, M.S. (2000). "Quiste parapróstático en caninos. Descripción de un caso clínico". *Revista de Medicina Veterinaria*, 81 (6) pp. 452-454.
- Stornelli, M.C., Stornelli, M.A., Savignone, C., Beluzan, I., Arauz, M.S., de la Sota, R.L. (2001). "Use of a triple stain technique for simultaneously evaluating of sperm viability and acrosomal status in canine semen". *Brazilian Journal of Animal Reproduction*, 25 (3) pp.464-466.
- Stornelli, M.A, Stornelli, M.C. (2002). "Hiperplasia prostática benigna en caninos: opciones terapéuticas". *Revista de Medicina Veterinaria*, 83(5) pp. 224-230.**

- Stornelli, M.A., Arauz, M., Baschard, S., de la Sota, R.L. (2003). "Unilateral and bilateral vasectomy in the dog: Alkaline Phosphatase as an Indicator of Tubular Patency". *Reproduction in Domestic Animals*, 38 (1) pp. 1-4.
- Thomassen, R., Farstad, W. (2009) "Artificial insemination in canids: A useful tool in breeding and conservation". *Theriogenology*; (71) 2 pp.190–199.
- Vera Muñoz, O. y Muñoz, M. (2005) Cómo mejorar la colección, manejo y calidad microbiológica del semen. *Manual de Ganadería Doble Propósito*, pp. 504-506. 2005
- Verstegen, J; Iguer-Ouada, M.; Onclin, K. (2002). "Computer assisted semen analyzer in andrology research and veterinary practice" (57), pp. 149-179.
- Villarroel, M. G. (2004). Estudio anatómico e histopatológico en próstata y testículos de perros de la ciudad de Valdivia, Chile. Tesis de Grado Tesis Electrónicas UACH Universidad Austral de Chile.. <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2004/fvc555e/doc/fvc555e.pdf>.
- Watson, P. (1990). "Artificial insemination and the preservation of semen". En: *Marshall's Physiology of Reproduction*. 2nd ed. Churchill Livingstone. London: Lamming, G. (ed.).



Foto 1: Extracción seminal manual sin vagina artificial.



Foto 2: Morfoanomalías espermáticas.



Foto 3: Tinción vital eosina/azul de anilina



Foto 4: Test hipoosmótico (Hypoosmotic Swelling Test, HOST).

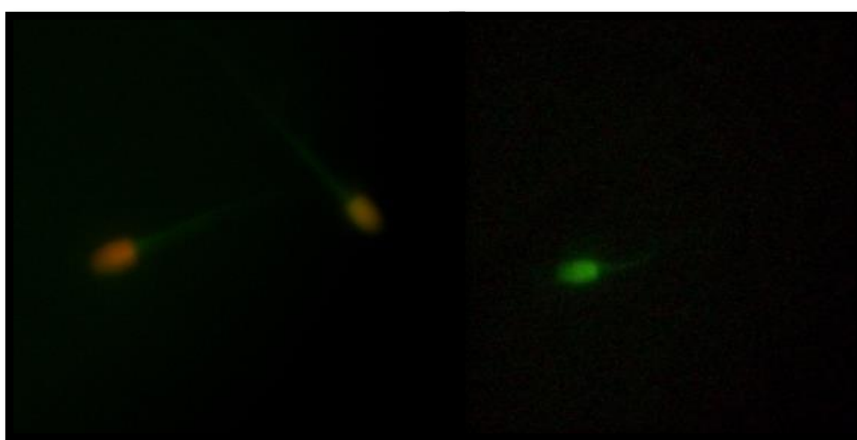


Foto 5: Integridad de membrana plasmática (DAPI-YP).

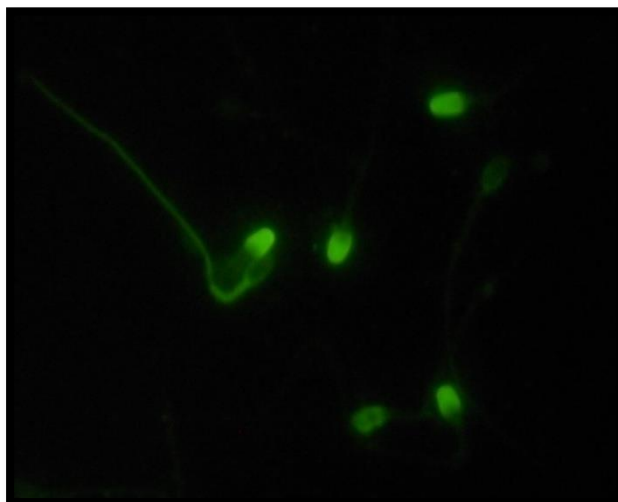


Foto 6: Integridad acrosómica (FITC-PSA)

CAPÍTULO 13

Extracción y evaluación seminal en felinos

María Candela Bonauro

Introducción

La evaluación de semen felino ha sido motivo de diversas investigaciones en la última década no solo por el interés de los investigadores en la reproducción del gato doméstico sino también por su uso como modelo experimental para el estudio de felinos silvestres. Es así que en los últimos años se han comunicado algunas particularidades fisiológicas de los gatos domésticos como por ejemplo la estacionalidad reproductiva y la fotorrefractoriedad que habían sido descritas varios años atrás en otras especies fotoperiódicas (Stornelli, 2007^a; Stornelli, 2007^b; Nuñez Favre y col. 2012^a; Nuñez Favre y col., 2012^b).

La extracción y posterior evaluación de semen brinda una valiosa información sobre la calidad de un eyaculado, permitiendo estimar la capacidad fecundante del mismo. Por otro lado, permite el diagnóstico de algunas enfermedades reproductivas.

Las técnicas que se utilizan para la obtención de semen en los felinos domésticos son extracción con vagina artificial y electroeyaculación (Zambelli y Cunto, 2006; Stornelli, 2007), siendo esta última la de elección en esta especie. Otros métodos, como la cateterización uretral o la recuperación espermática son usados con menos frecuencia. Los espermatozoides obtenidos por recuperación de la cola del epidídimo permiten conservar material genético post-mortem y son ampliamente utilizados en investigación. (Hay y Goodrowe, 1993; Zambelli y Cunto, 2006; Bonauro y col., 2011; Bonauro y col., 2012; Bonauro y col., 2013^{a, b, c}).

Luego de la extracción y obtención del material seminal se realiza la evaluación del mismo mediante diferentes pruebas, las cuales por el escaso volumen que se obtiene en esta especie, deben ser cuidadosamente seleccionadas para estimar la calidad de la muestra y poder relacionarla con la capacidad reproductiva del macho. Dentro de las pruebas que se realizan se incluyen motilidad espermática, concentración espermática, porcentaje de espermatozoides vivos (viabilidad) y morfología espermática (Stornelli, 2007).

Existen otras técnicas complejas y más costosas como el uso de tinciones fluorescentes y microscopía electrónica, las cuales suelen reservarse solo para casos especiales o investigación.

Extracción seminal

Extracción mediante vagina artificial

La obtención de semen mediante vagina artificial (VA) si bien no requiere sujeción física o química, lo que podría verse como una gran ventaja, requiere una hembra en celo o un súcubo (por ejemplo un muñeco de peluche) y entrenamiento previo del macho (Foto 1). Los animales bien sociabilizados y entrenados desde cachorros logran ser preparados más fácilmente para eyacular con esta técnica. Así mismo son pocos los animales que responden al entrenamiento y logran eyacular con la VA (Axner y Linde-Forsberg, 1998; Zambelli y Cunto, 2006).

Para realizar la colecta de semen con VA el operador debe estar familiarizado con la fisiología del servicio felino. La VA puede fabricarse utilizando un tubo tipo ependorf (Foto 2), previo a la obtención de la muestra la VA debe ser atemperada a 37°C, luego se colocará sobre el pene del macho cuando este realice la monta, para coleccionar el eyaculado (Zambelli y Cunto, 2006). Como se ha mencionado anteriormente en el capítulo que trata sobre fisiología reproductiva, la eyacuación en el gato ocurre muy rápidamente por lo cual el operador debe estar muy atento y colocar la VA en el momento justo que el animal realiza la estocada. Si la maniobra de posicionamiento de la VA no se realiza perfectamente sincronizada con la estocada del macho se perderá el eyaculado.

Extracción mediante electroeyacuación

La obtención de semen mediante electroeyacuación requiere el uso de un anestésico general, por lo tanto debe realizarse en animales sanos. Las drogas de uso más frecuente son la ketamina (25 mg/kg i.m) combinada con xilazina (1 mg/kg i.m), o medetomidina (140 µg i.m).

Se debe contar con un electroeyaculador, el cual está compuesto por una fuente de voltaje y un vástago en el cual se encuentran los electrodos que conducirán los estímulos eléctricos (Foto 3, 4). El vástago lubricado se introduce en el recto con los electrodos hacia la pared ventral del mismo, aproximadamente unos 5-7 cm para posicionarlo a nivel de la próstata, luego se realiza la exteriorización del pene colocando sobre el mismo un tubo tipo ependorf. Una vez posicionado el vástago y el ependorf se comienza con la descarga de estímulos eléctricos.

Existen distintos protocolos de electroeyaculación en felinos los cuales varían tanto en el número de impulsos como en los voltios utilizados en cada serie. Uno de los protocolos ampliamente utilizado es del descrito por Howard en 1990, el mismo consta de 80 estímulos divididos en 3 series con un descanso de 2-3 minutos entre ellas. El voltaje utilizado va de 2 a 5 voltios, si el estímulo es correcto y el vástago se encuentra bien posicionado, se observa la extensión de los miembros posteriores (Howard y col., 1990).

Mediante electroeyaculación se obtiene una muestra de mayor volumen pero con menor concentración espermática que cuando la muestra es colectada mediante VA (Dooley y Pineda, 1986). El número de espermatozoides eyaculados dependerá del voltaje y número de estímulos, pero el volumen no se verá afectado por el protocolo utilizado (Pineda, 1984). La muestra obtenida mediante electroeyaculación puede tener un pH más alto que la obtenida mediante VA, probablemente por la mayor cantidad de secreción proveniente de las glándulas accesorias (Zambelli y Cunto, 2006).

Se ha observado que la eyaculación retrógrada de una parte del eyaculado ocurre durante la eyaculación felina en forma fisiológica. Dooley, 1991 comunicó que un alto número de espermatozoides se pierden debido al flujo retrogrado hacia la vejiga no solo durante la electroeyaculación sino también con VA en el gato doméstico (Dooley y col., 1991). La eyaculación retrógrada de parte del eyaculado ocurrida en la colección de semen mediante electroeyaculación puede reducirse utilizando medetomidina en lugar de ketamina (Zambelli y col., 2007).

Cateterización uretral

La extracción de semen mediante cateterización uretral (CU), requiere la administración de drogas anestésicas (medetomidina, ketamina) y una sonda urinaria (1.0 mm x 13.0 cm). En el procedimiento de CU una sonda urinaria tipo Tom cat[®] es introducida en la uretra realizándose una serie de 5 a 7 deslizamientos luego de lo cual podrá observarse el eyaculado dentro de la sonda. La CU se caracteriza por alta concentración, bajo volumen y bajo pH, la gran ventaja reside en su poca complejidad (Zambelli y col., 2010).

Recuperado epididimal

La recuperación de espermatozoides a partir de la cola del epidídimo, es una técnica sencilla que permite obtener a partir de la cola del epidídimo espermatozoides maduros y potencialmente fértiles. Es una herramienta valiosa a la hora de conservar material genético de un individuo y puede ser la única alternativa para la obtención de espermatozoides en algunas situaciones, tales como muerte súbita o enfermedades que requieran la orquitectomía del animal, esta técnica cumple un rol fundamental en animales en vías de extinción, el gato domestico ha sido tomado como modelo para los felinos silvestres, creando la necesidad de avanzar en los estudios en esta especie.

Evaluación seminal

La evaluación seminal es una valiosa herramienta para estimar la capacidad reproductiva de un macho, pero no debe ser considerada como un único método aislado sino como parte de un conjunto de valoraciones realizadas al macho en la evaluación reproductiva (Stornelli, 2007). Además se debe tener presente que una sola evaluación no nos permite arribar a un diagnóstico definitivo de la producción espermática de un reproductor.

Por cuestiones prácticas al examen seminal podemos dividirlo en examen físico-químico, macroscópico, microscópico y bacteriológico.

Análisis físico-químico

PH: varía entre 6,6 y 7,8 (Johnston y col., 2001; Stornelli, 2007).

Osmolalidad: 320 mOsm (Johnston y col., 2001).

Examen macroscópico

La evaluación macroscópica incluye el volumen, color y aspecto. El volumen suele ser pequeño variando entre 0,12 y 0,25 ml mediante VA y puede alcanzar entre 0,5 y 0,8 ml utilizando electroeyaculador. El color generalmente es blanquecino, pudiendo variar a rojizo si se contamina con sangre y amarillento si se contamina con orina. El aspecto es ligeramente opalescente (Foto 5).

Examen microscópico

Todas las pruebas deben realizarse con material limpio (sin contaminantes) y atemperado sobre platina térmica para evitar toxicidad y/o el shock térmico lo cual afecta negativamente los parámetros seminales, dando lugar a resultados que no reflejan la calidad seminal fecundante del macho.

Motilidad individual (MI): una gota de 10µl de semen es colocada sobre un portaobjetos atemperado a 37°C, sobre la misma se coloca un cubreobjetos también atemperado y se observa en microscopio a 400X. A partir de la observación de varios campos se estima el porcentaje de células con motilidad progresiva es decir que atraviesan el campo microscópico (0-100%). En gatos normales el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva ha sido estimado entre 60-90% (Axner y Linde-Fosberg, 1998; Johnston y col., 2001).

Vigor (VI): es la velocidad con que las células atraviesan el campo. Se clasifica mediante una escala de 0-5. Donde 0 representa inmovilidad, 1-2 movimientos circulares u oscilatorios en el lugar, 3 movimiento progresivo lento, 4 movimiento progresivo rápido y 5 movimiento progresivo muy rápido. Una gota de 10 µl de semen es colocada sobre un portaobjetos atemperado a 37°C, sobre la misma se coloca un cubreobjetos también atemperado y se observa en un microscopio a 400X. El vigor normal de gatos normales ha sido estimado entre 3-5. El uso de sistemas computarizados para evaluación de la motilidad y vigor espermático (ej: CASA) permite una estimación más objetiva de estos parámetros que la evaluación microscópica estimada por operador. Concentración espermática (CE)/espermatozoides totales (ET): como se ha demostrado la producción espermática en el gato domestico puede variar con la estación del año (Nuñez y col., 2012), en relación a este hecho el número de espermatozoides totales puede variar entre 13×10^6 a 153×10^6 (Axner, 2000). La concentración espermática puede calcularse utilizando una dilución 1:200 o 1:20 de semen en solución fisiológica formolada al 2%, según trabajemos con semen normo o hipospérmico. Luego con la dilución seminal se carga la cámara de Neubauer (Foto 6), aplicándose la técnica y la fórmula utilizada para conteo de glóbulos rojos o blancos según la dilución utilizada. Se obtiene así la concentración por unidad de volumen. La cantidad total de espermatozoides se calcula obteniendo el producto de la concentración espermática por el volumen del eyaculado.

Porcentaje de espermatozoides vivos: se realiza mezclando una gota de semen con una gota de tinción vital, las más utilizadas son la eosina-nigrosina o eosina-azul de anilina. Se observa al microscopio con objetivo de inmersión a 1000X. Las células vivas no se colorean mientras que las células muertas permiten el paso del colorante debido a la alteración de la permeabilidad de membrana observándose coloreadas (Zambelli y col., 1993). (Foto 7).

Morfología espermática (ME): El gato doméstico ha sido clasificado como teratospérmico en relación al alto porcentaje de anomalías espermáticas presentes en el semen de gatos sanos y fértiles. Cuando los valores son > a 60 % se habla de normospermia y con valores < a

30 % de teratospermia (Pukazhenthil y col., 2001; Zambelli y Cunto, 2006). El espermatozoide felino de un semen normospermico mide alrededor de 26 μm de largo.

El estudio de microscopía óptica permite observar mediante distintas tinciones (T15, giemsa) alteraciones espermáticas del acrosoma como quistes, hinchamientos, de la cabeza macro y microcefalia, cabezas globosas, piriformes, alargadas y dobles, de la pieza intermedia doble, deshilachada, doblada, gotas distales e inserción excéntrica, de la cola como cola doble, enrollada, Dag y falta de la porción terminal (Platz y col., 1978; Howard y col., 1993; Nuñez y col., 2011; Bonaura y col., 2013). (Foto 8).

Integridad de membrana

Las tinciones fluorescentes nos permiten evaluar la integridad de las membranas celulares con mayor sensibilidad que otras técnicas, pero son costosas y se requiere de infraestructura mayor a la de un laboratorio clínico para su utilización, por este motivo suele restringirse su uso a la investigación.

La tinción de Diacetato de Carboxifluoresceína (DIC) combinada con Yoduro de Propideo (YP) es una de las tinciones fluorescentes utilizadas para evaluar integridad de membrana.

DIC: Diacetato de Carboxifluoresceína; es un éster no polar que atraviesa la membrana plasmática y en el interior de la célula es hidrolizado por esterasas no específicas volviéndose impermeable a la membrana plasmática. Al ser incidido por una luz ultravioleta se ve color verde (Harrison y Vickers, 1990).

YP: Yoduro de Propideo; es una sonda con gran afinidad por los ácidos nucleicos y solo atraviesa la membrana espermática cuando esta se encuentra dañada debido a que íntegra no es capaz de penetrarla. Al ser incidido por una luz ultravioleta fluoresce color rojo (Harrison y Vickers, 1990).

Cuando se utiliza la tinción combinada de DIC y YP los espermatozoides que poseen membrana plasmática íntegra se observan verde manzana y los que poseen la permeabilidad de la membrana plasmática alterada se observan rojos (Foto 9).

Integridad acrosómica

Es importante evaluar la integridad del acrosoma, debido al significativo rol que cumple esta organela en el proceso de fertilización, motivo por el cual debe mantenerse intacto hasta el momento en que esta ocurra. La morfología e integridad acrosómica pueden evaluarse mediante microscopio de contraste de fase, microscopio electrónico de transmisión, lectinas

marcadas con sustancias fluorescentes y anticuerpos monoclonales (kawakami y col., 1993; Strom y col., 1998).

Pisum Sativum agglutinin: es el compuesto más frecuentemente utilizado para evaluar el acrosoma, debido a que posee afinidad por proteínas específicas de la membrana acrosomal, al conjugarse con un compuesto fluorescente (carboxifluoresceína) y ser expuesto a una luz ultravioleta nos permite evaluar la presencia/ausencia del acrosoma así como su integridad (Mendoza y col., 1992). (Foto 10).

Microscopía electrónica

La evaluación morfológica usando microscopía electrónica de transmisión o de barrido es muy valiosa porque provee información detallada acerca de la morfología e integridad de la célula espermática que no es posible obtener por medio de otras metodologías. El estudio de microscopía electrónica permite observar alteraciones acrosomales, defecto de “Dag”, colas dobles, cabezas dobles, axonemas incompletos. Existe una gran variedad de anomalías espermáticas tanto en el estudio de microscopía óptica como en el de microscopía electrónica (Bonaure y col., 2013). Bonaure y col. describieron por primera vez en felinos las anomalías espermáticas observadas al microscopio electrónico y las relacionaron con las observadas al microscopio óptico (Bonaure y col., 2013) (Foto 11, 12, 13).

Plasma seminal

El plasma seminal está compuesto por el producto de las glándulas sexuales accesorias, es secretado durante la eyaculación y brinda un soporte a los espermatozoides en el eyaculado (Zambelli y col., 2010). Está compuesto por varias proteínas incluyendo varias enzimas (fosfatasa alcalina, alanino-amino transferasa, aspartato-amino transferasa), lípidos, macroelementos (Na, K, Ca, Mg, P, Cl) y microelementos (Cu, Fe, Zn) (Johnston y col., 2001). García y col. han descrito la relación entre la calidad del semen felino y la concentración de colesterol y triglicéridos observando una relación entre la concentración de estos compuestos y la calidad seminal (García y col., 2013).

Examen bacteriológico

Los mismos microorganismos aislados en la uretra distal y prepucio del macho son los aislados en el cultivo de semen. En diferentes estudios E coli, Pseudomona Aeruginosa,

Proteus mirabilis, *Klebsiella* SP, *Streptococo* y *Stafilococo* han sido identificados (Herron, 1977; Concannon y Lein 1983; Johnston y col., 2001). Sin embargo no se encuentra definida aún la relevancia de los mencionados microorganismos en la producción de afecciones reproductivas en felinos.

Conclusión

En los últimos años ha crecido el interés en el conocimiento de la fisiología reproductiva del gato doméstico ya que permite una mejor comprensión de las variaciones que puedan presentarse en los parámetros estudiados. Conocer con mayor profundidad la reproducción en la especie permitirá adoptar la biotecnología reproductiva más adecuada para optimizar los resultados. El gato doméstico tiene un especial interés debido a que es usado como modelo para felinos silvestres.

La extracción y evaluación seminal nos permite estimar la capacidad reproductiva de un macho en un momento determinado. La obtención de la mayor cantidad de datos de un individuo disminuye el error y la subjetividad de los resultados arribando de esta manera a un resultado más confiable.

Bibliografía

- Axnér E, Linde-Fosberg C. (1998). "Mating and artificial insemination in Small animal reproduction and neonatology (eds)" G. Simpson, G. C. England and M. Harvey, Cheltenham: BSAVA. Pp. 105-111.
- Axner E. (2000). "Sperm morfology and maturation in the domestic cat (*Felis Silvestris Catus*), with special reference to the morfology and function of the epididymis". *Acta Univ Agric Suec*, v.60, (p.9-39).
- Bonaura M.C; Praderio, R.; Nuñez Favre, R.; Tittarelli CM, Stornelli, M.A. (2012). "Efecto de la adición de Dimetilformamida a un diluyente Tris base sobre la supervivencia de espermatozoides epididimales felinos pos descongelados". *Terceras Jornadas Internacionales del Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal*. Facultad de Ciencias Veterinarias: Universidad de Buenos Aires. Resolución (CD) N: 1637/120.
- Bonaura MC, Jurado S, Nuñez Favre R, García Mitacek, Sarmiento P, Stornelli MA. (2013). "Anormalidades espermáticas en el gato doméstico (*Felis silvestris catus*)". *12th Inter-American Microscopy Congress*. Cartagena de Indias: Colombia.
- Bonaura MC, Praderio R, Tittarelli MC, Nuñez Favre R, Stornelli MA. (2012). "Efecto de la adición de Dodecil Sulfato de Sodio a un diluyente Tris base sobre la supervivencia de espermatozoides epididimales post descongelación". *XIII Jornadas de Divulgación Técnico Científicas*.
- Bonaura MC., Núñez Favre R., Mansilla Hermann D., Tittarelli C., Stornelli MA. (2011). "Efecto de la adición de trealosa a un diluyente tris base sobre la supervivencia espermática al descongelado en felinos". *Jornada de Jóvenes Investigadores*. Facultad de Ciencias Veterinarias: Universidad de Buenos Aires.
- Bonaura MC; Jurado S; Nuñez Favre R; García Mitacek; Sarmiento P; Stornelli MA. (2013). "Anormalidades espermáticas en el gato doméstico (*Felis silvestris catus*)". *Comité Interamericano de Sociedades de Microscopía (CIASEM) y la Asociación Colombiana de Microscopía (ASOCM)*. Colombia: Cartagena.
- Bonaura, M.C.; Praderio,R.; Nuñez Favre, R.; Tittarelli, C.M.; Stornelli, M.C.; Stornelli, M.A. (2013). "Efecto de la adición de trealosa a un diluyente tris base sobre la supervivencia de espermatozoides epididimales al descongelado en el Gato doméstico (*Felis catus*)". *XIV Jornadas de Divulgación Técnico Científicas*. Facultad de Ciencias Veterinarias: Universidad Nacional de Rosario.
- Concannon PW, Lein DH. (1983). "Feline reproduction". (8th ed) In: Kirk RW. *Current veterinary therapy*. Philadelphia: WB Saunders. (P.932-936).
- Dooley MP, Pineda MH. (1981). "Effect of method of collection on seminal characteristics of the domestic cat". *Am. J Vet Res*, v.47, (p.286-292).

- Dooley MP, Pineda MH, Hopper GJ and Hsu WH (1991). "Retrograde flow of spermatozoa into urinary bladder of cat during electroejaculation, collection of semen with artificial vagina, and mating". *American journal of Veterinary Research* v 52 (p.687-691).
- García F, Nuñez Favre R, Stornelli M. C, García Mitacek MC, Praderio RG, Stornelli M. A. (2013). "Relación entre parámetros seminales y concentración de colesterol y triglicéridos en plasma seminal felino". *XV Congreso y 12 Jornadas de educación de la sociedad de ciencias morfológicas*. La Plata.
- Harrison RAP, Vickers SE. (1990). "Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa". *J. Reprod. Fert.* v.88 (p.343-52).
- Hay MA and Goodrowe KL. (1993). "Comparative cryopreservation and capacitation of spermatozoa from epididymides and vasa deferentia of the domestic cat". *J Reprod Fert.* v47 (p.297-305).
- Herron MA. (1977). "Feline reproduction". *Vet Clin North Am.* v.7, (p.715-722).
- Howard JG, Donoghue AM, Johnston LA, Wildt DE, (1993) "Zona pellucida filtration of structurally abnormal spermatozoa and reduced fertilization in teratospermic cats". *Biol Reprod.* v49: (p.131-139).
- Howard JG, Brown JL, Bush M, Wildt DE.(1990). "Teratospermic and normospermic domestic cats: ejaculate traits, pituitary-gonadal hormones, and improvement of spermatozoal motility and morphology after swim-up processing". *J Androl.* v11 (p.204-215).
- Johnston DJ, Kuztritz MVR, Olson P. (2001). "Canine and feline". *Theriogenology*. WB Saunders: Philadelphia (p. 287-306).
- Kawakami, E.; Vandevootrt, c.a.; Mahi-Brown, c.a.; tollner, t.l.; overstreet, J.W. (1993). "Comparison of fluoreseinated lectin stain with triple staining for evaluating acrosome reaction of dog sperm". *J. Exp. Zool.* v265 (p.599-603).
- Mendoza C, Carreras A, Moos J, Tsarik J. (1992). "Distinction between true acrosomal reaction and degenerative acrosome loss by one-step staining method using *Pisum sativum* agglutinin". *J. Reprod. Fertil.* v95 (p755-763).
- Núñez Favre R, Bonaura MC, Praderio R, de la Sota RL, Rojas Zamora CA, Stornelli MA. (2011). "Ocurrencia de anomalías espermáticas en el gato doméstico (*Felis catus*)". *I Simposio Latinoamericano de Reproducción Animal*. Viña del Mar: Chile.
- Núñez-Favre R, Bonaura MC, Tittarelli CM, Mansilla-Hermann D, de la Sota RL, Stornelli MA. (2012). "Effect of natural photoperiod on epididymal sperm quality and testosterone serum concentration in domestic cat (*Felis silvestris catus*)". *Reprod Dom Anim.* v47 (p.232-234).
- Núñez-Favre R, Bonaura MC, Tittarelli CM, Mansilla-Hermann D, de la Sota RL, Stornelli MA. (2012). "Effect of natural photoperiod on epididymal sperm quality and testosterone serum concentration in domestic cat (*Felis silvestris catus*)". *Reprod Dom Anim.* v47 (p.232-234).
- Pineda MH. (1984). "Effect of voltage and order of voltage application on seminal characteristics of electroejaculates of the domestic cat". *Am J Vet Res.* v.45 (8).

- Platz CC, Wildt DE, Seager SW. (1978). "Pregnancy in the domestic cat after artificial insemination with previously frozen spermatozoa". *J Reprod Fertil* v52 (p.279–82).
- Pukazhenthi BS, Wildt DE, Howard JG. (2001). "The phenomenon and significance of teratospermia in felids". *J Reprod Fertil* v57 (p.423-33).
- Stornelli MA. (2007). "Particularidades fisiológicas de la reproducción en felinos. Physiological aspects of feline reproduction". *Rev Bras Reprod Anim*, 31(1) (p.71-76).
- Stornelli, M.A. (2007). "Evaluación de semen en el gato doméstico: análisis de rutina y metodologías especiales felino". *Curso de Reproducción Animal, Instituto de Teriogenología, Departamento de Ciencias Clínicas, Facultad de Ciencias Veterinarias: Universidad Nacional de La Plata*
- Strom Holst, B.; Rota A.; Andersen Berg, K.; Linde Fosberg, C.; Rodriguez Martinez, H. (1998). "Canine sperm head damage after freezing-thawing: ultraestructural evaluation and content of select elements". *Reprod. Dom. Anim.* v33.
- Zambelli D, Bergonzoni ML, De Fanti C, Carluccio A. (1993). "Sperm morphology evaluation techniques in the cat, rabbit and dog". *S.I.S. Vet. Proceedings vol. XLVII*, Riccione, Grafiche Scuderi s.a.s., Messina, (p.279–283).
- Zambelli D, Cunto M. (2006). "Semen collection in cats: techniques and análisis". *Theriogenology*, v.66 (p.159-165).
- Zambelli D, Cunto M, Prati F, Merlo B. (2007). "Effects of ketamine or medetomidine administration on quality of electroejaculated sperm and on sperm flow in the domestic cat". *Theriogenology*. v15; 68(5) (p.796-803).
- Zambelli D, Raccagni R, Cunto M, Andreani G, Isani G. (2010). "Sperm evaluation and biochemical characterization of cat seminal plasma collected by electroejaculation and urethral catheterization". *Theriogenology*. v74(8) (p.1396-402).



Foto 1: gato macho montando a hembra en celo.



Foto 2: tubos tipo ependorf calibrados (ml). Distintas medidas

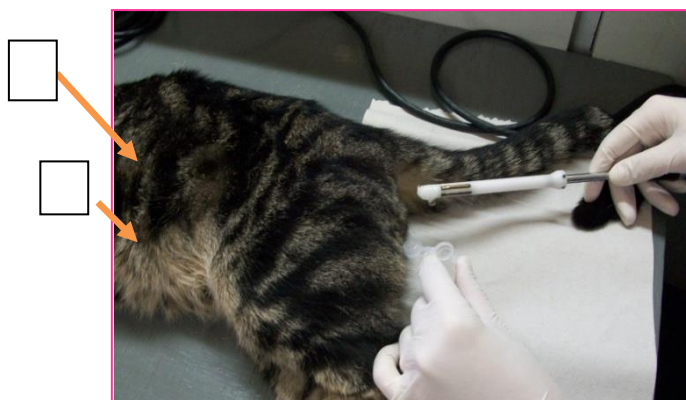


Foto 3: En la imagen se observa un tubo colector de pequeño calibre (A) y el vástago con electrodos lineales (B).



Foto 4: Fuente de voltaje.



Foto 5: Colectas seminales obtenidas mediante electroeyaculador.



Foto 6: Cámara de Neubauer



Foto 7 MO: tinción vital (eosina-nigrosina): espermatozoide felino vivo (blanco), espermatozoide felino muerto (rosado).



Foto 8: Anormalidades espermáticas (teñidas T15) observadas al microscopio óptico 100 X. Cabeza doble (A), cabeza triple (B).

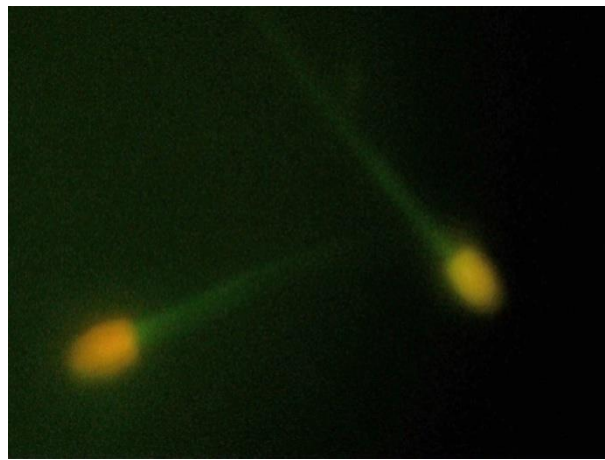


Foto 9 MF: Tinción fluorescente (DIC y YP): espermatozoides que poseen permeabilidad de membrana plasmática alterada (rojos).



Foto 10: Tinción fluorescente (DIC y YP): espermatozoides que poseen permeabilidad de membrana plasmática intacta (verdes).

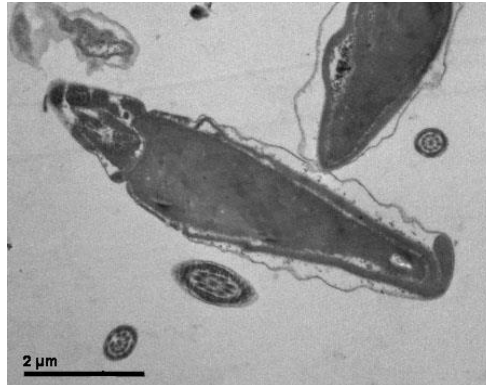


Foto 11 MET: Corte longitudinal a nivel de la cabeza de 2 espermatozoides. Se observan acrosomas defectuosos.

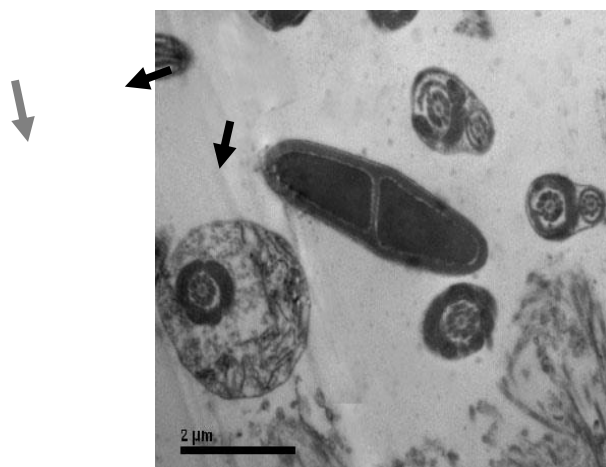


Foto 12 MET: Se observan cabezas dobles (flecha gris), gota citoplasmática (flecha blanca), colas dobladas (flechas negras).

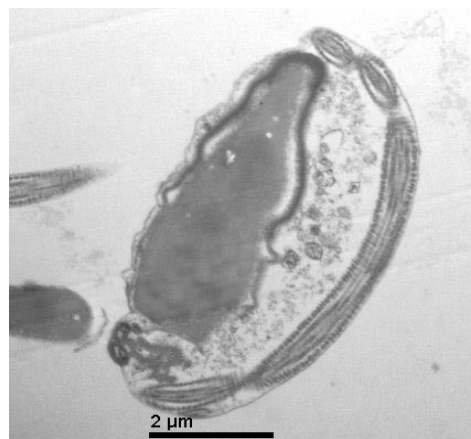


Foto 13 MET: "Dag": caracterizado por el enrollamiento de la cola alrededor de la cabeza envuelta por una membrana plasmática intacta.

CAPÍTULO 14

Ultrasonografía reproductiva en pequeños animales

María Carla García Mitacek

Introducción

La evaluación ultrasonográfica del tracto reproductivo en caninos y felinos es una importante herramienta que posibilita obtener datos que complementan el examen clínico reproductivo. La información obtenida permite evaluar la conformación anatómica normal, procesos fisiológicos (ovulación, gestación, etc) o procesos patológicos (ovarios quísticos, complejo hiperplasia endometrial quística - piómetra, hiperplasia prostática benigna, etc). Es importante destacar que en los procesos patológicos el estudio ultrasonográfico, permite aproximar el diagnóstico mediante imágenes que en muchos casos son compatibles con 2 o más procesos, debiendo utilizarse otros métodos complementarios para arribar a diagnóstico definitivo. Así mismo, el seguimiento ultrasonográfico permite evaluar la progresión de la enfermedad o en el caso de implementar un tratamiento, evaluar la respuesta al mismo.

Generalidades

La ultrasonografía o ecografía es un método de diagnóstico complementario por imágenes. La formación de la imagen ecográfica se basa en el principio del pulso-eco. El método utiliza un transductor, dentro del cual se encuentran cristales piezoeléctricos que actúan como emisores y receptores electromecánicos de sonidos. Las ondas de ultrasonido generadas en el transductor, al chocar con elementos reflectantes (interfases, tejidos) generan ecos que vuelven al lugar de origen. El eco es recibido y representado en forma de imagen, la cual se visualiza en la pantalla del equipo ultrasonográfico (Figura1).

Interpretación de la imagen y terminología

Las imágenes ultrasonográficas representan cortes tomográficos de órganos y tejidos. Permiten valorar la situación, tamaño, forma, extensión, delimitación y arquitectura interna (Fritsch y Gerwing, 1996).

Para describir las imágenes observadas se utilizan los siguientes términos (Figura 2):

- Anecoico o anecogénico: área negra homogénea por ausencia de ecos. Representa líquidos homogéneos, por ejemplo orina, bilis.
- Hipoecoico o hipoecogénico: área gris oscura producida por escasos ecos de débil intensidad. Representa tejidos blandos que producen una reflexión media por ejemplo sangre, abscesos. Sin embargo, los órganos parenquimatosos producen una reflexión algo superior y la imagen será de un gris más claro.
- Hiperecoico o hiperecogénico: imagen blanca por gran reflexión de ecos, por ejemplo hueso o tejido conjuntivo denso.

Los términos utilizados para describir el aspecto de las imágenes ecográficas deben referirse a la intensidad de los ecos del tejido y la textura de la imagen. Estos términos describen el aspecto ecográfico en relación con el tejido circundante u otras estructuras (Fritsch y Gerwing, 1996).

La textura de la imagen está en relación con el tamaño, el espaciamiento y la regularidad de los puntos que forman dicha imagen. Los puntos pueden ser pequeños, medianos o grandes y pueden estar muy próximos o ampliamente espaciados. Además, el tamaño y espaciamiento pueden ser uniformes (regular, homogéneo) o no uniformes (irregular, heterogéneo). Una textura del parénquima fina o grosera se refiere al tamaño pequeño o grande del punto, respectivamente. Una textura uniforme sugiere un tamaño y espaciamiento similar de los puntos por todo el parénquima. Una textura heterogénea sugiere que el tamaño de los puntos,

el espaciamiento o ambos pueden variar a lo largo del parénquima (Fritsch y Gerwing, 1996). Por lo tanto, los términos homogéneo y heterogéneo pueden hacer referencia tanto a la ecogenicidad como a la textura (Figura 3).

Modos de presentación

Existen tres modos ecográficos, dos de los cuales se utilizan frecuentemente en las aplicaciones clínicas en medicina veterinaria.

- **Modo A** (modo amplitud): es el que se usa con menor frecuencia, pero aun puede tener una utilidad especial para exploraciones oftalmológicas y otras aplicaciones que requieran mediciones precisas de longitud o profundidad. Sin embargo, en pequeños animales no es utilizado para realizar exploraciones del tracto genital de la hembra o el macho.
- **Modo B** (modo brillo): representa los ecos que regresan como puntos, el brillo o la escala de grises es proporcional a la amplitud de los ecos de regreso y la posición corresponde a la profundidad en la que el eco se origina a lo largo de una línea única desde el transductor. El modo B es representado normalmente con el transductor situado en la parte superior de la pantalla y con la profundidad aumentando hacia el fondo de la misma (Figura 4).
- **Modo M** (modo movimiento): se utiliza en ecocardiografía junto con el modo B para evaluar el corazón. Las representaciones en modo M registran la profundidad en el eje vertical y el tiempo en el eje horizontal. La imagen se orienta con el transductor en la parte superior. El movimiento se registra respecto al tiempo en forma de ondas. Las representaciones ecográficas en modo M son útiles para tomar la frecuencia cardíaca fetal [Figura 4] (Nyland y Mattoon, 2002).

Preparación del paciente

El estudio ultrasonográfico requiere de una preparación previa del paciente que consiste en una retención urinaria de 1-2 h, esto resulta de suma importancia ya que la vejiga se utiliza como ventana acústica, es decir el líquido contenido dentro de éste órgano evita el hueso y/o gas del abdomen, permitiendo de ésta forma poder evaluar correctamente el trato genital de la hembra y del macho. Así mismo, es recomendable un ayuno sólido de 8-12 h para disminuir la presencia de gas a nivel intestinal, el cual podría interferir la visualización de los órganos reproductivos durante el examen ecográfico (Nyland y Mattoon, 2002; Fritsch y Gerwing, 1996).

Previo a comenzar con el examen ultrasonográfico es recomendable rasurar el pelo de la zona del ventral y lateral del abdomen, ya que el pelo interfiere en el pasaje del ultrasonido. Otro aspecto a tener en cuenta es la utilización de gel acústico para conseguir un correcto contacto acústico entre el transductor y la piel del paciente (Nyland y Mattoon, 2002; Fritsch y Gerwing, 1996).

La sedación del paciente normalmente no es necesaria, mientras que la anestesia general será necesaria en raras ocasiones (ej. biopsia eco-guiada) (Nyland y Mattoon, 2002; Fritsch y Gerwing, 1996).

Técnica de exploración

Tipo de transductor: para la realización del examen ultrasonográfico del aparato reproductor en pequeños animales se pueden utilizar transductores de 5, 7.5 o 10 Mhz. Sin embargo, en caninos de talla pequeña (< 10 kg) y felinos pueden examinarse con transductores de 7.5 - 10 MHz. Mientras que los caninos de talla media, grande o gigante necesitan frecuencias de 5 - 7.5 MHz. Dependiendo del equipo ultrasonográfico, el ecografista puede necesitar cambiar las frecuencias varias veces durante la exploración para optimizar el equilibrio entre la resolución y la penetración (Nyland y Mattoon, 2002).

Posición: El paciente se coloca generalmente en decúbito dorsal. Sin embargo, para una exploración óptima son posibles muchas posiciones, incluyendo decúbito lateral derecho o izquierdo. Así mismo, el examen ecográfico puede realizarse con el animal en estación, la cual puede ser una técnica útil en animales que resisten a estar en decúbito dorsal. Tener al paciente en estación en el suelo es una ventaja en caninos de razas grandes o gigantes. Así mismo, resulta importante remarcar que para visualizar el tracto reproductivo entero pueden necesitarse varias posiciones y planos de exploración (Nyland y Mattoon, 2002).

Ultrasonografía reproductiva en la perra y la gata

El aparato reproductivo de la hembra consta de los ovarios, las trompas uterinas, el útero, la vagina y la vulva. Los ovarios y el útero se observan bien mediante ultrasonografía. Sin embargo, la vagina y la vulva normalmente se evalúan mejor mediante inspección visual directa o vaginoscopia (Nyland y Mattoon, 2002; Fritsch y Gerwing, 1996).

Ovarios

Los ovarios pueden ser identificados mediante un estudio minucioso del área caudal y lateral de cada riñón. Sin embargo, los ovarios pueden confundirse con el mesenterio adyacente, haciendo difícil su identificación [Tabla 1: Foto 1 – 2] (Nyland y Mattoon, 2002).

El aspecto ultrasonográfico de los ovarios varía durante el ciclo estral. En el anestro y el proestro temprano los ovarios se visualizan hipoecoicos homogéneos, ovalados y de contorno poco definidos. En el proestro tardío y estro se visualizan folículos anecogénicos, que aumentan de tamaño hasta que se produce la ovulación. La presencia de múltiples folículos pequeños puede causar un ovario difusamente hiperecogénico, sin permitir identificarlos individualmente. Los folículos más grandes se caracterizan por una pared delgada hiperecoica, un centro líquido anecoico y refuerzo posterior. El tamaño puede ser de unos pocos milímetros hasta superior a 1 cm cuando esta próximo a la ovulación. La superficie externa del ovario puede ser irregular o con lobulaciones. En la perra, la ovulación se puede detectar ecográficamente cuando hay una disminución en el número y tamaño de los folículos de un día a otro. Por lo tanto, la detección ecográfica de la ovulación en la perra requiere de exploraciones diarias para poder identificar cambios en el aspecto del ovario. Resulta de suma importancia la correlación con otros métodos complementarios (citología vaginal, niveles de P₄, etc.) para poder identificar el estadio del ciclo estral (Nyland y Mattoon, 2002; Fritsch y Gerwing, 1996).

Una vez producida la ovulación, en el ovario se visualizan áreas multifocales anecoicas o hipocogénicas así como también áreas hiperecogénicas, representando los cuerpos lúteos y los cuerpos hemorrágicos. Durante el diestro los ovarios pasan de forma ovalada a redondeada y se visualizan cuerpos lúteos hipocogénicos (Nyland y Mattoon, 2002; Fritsch y Gerwing, 1996).

Estudios realizados sobre el seguimiento ultrasonográfico del ciclo estral de la perra permitieron evaluar el desarrollo folicular y ovulación. Sin embargo, para poder realizar este estudio se requiere de equipos ultrasonográficos de alta resolución que permitan efectuar un correcto seguimiento folicular (Nyland y Mattoon, 2002; England y Allen, 1989).

Enfermedades del ovario

Enfermedad quística ovárica

Los quistes foliculares se caracterizan por un contenido anecoico, paredes delgadas y refuerzo posterior. Los quistes pueden ser únicos o múltiples, unilaterales o bilaterales. El tamaño varía de pequeños a grandes y generalmente se visualiza un incremento del tamaño del ovario (Nyland y Mattoon, 2002; Fritsch y Gerwing, 1996).

Neoplasias

Los tumores ováricos pueden reconocerse ecográficamente como una masa en relación a uno o ambos ovarios. Si alcanzan el tamaño suficiente, se observará una masa en el abdomen medio. Los tumores pueden ser sólidos o con un componente quístico. Los márgenes pueden ser lisos o irregulares. Si durante el examen ultrasonográfico se llega al diagnóstico presuntivo de una neoplasia, es importante evaluar el resto de los órganos internos en busca de evidencia de enfermedad metastática. Sin embargo, no es posible determinar el tipo del tumor en base a las observaciones ultrasonográficas, solo el estudio histopatológico podrá identificar el tipo de neoplasia (Nyland y Mattoon, 2002; Fritsch y Gerwing, 1996; Dickie A, 2006).

Granuloma de muñón ovárico

Se visualiza como masas complejas en la región del ovario. Éstas pueden variar en tamaño, forma, textura y ecogenicidad. Por lo general, predominan lesiones complejas o lesiones quísticas. Un hallazgo secundario es la obstrucción del ureter adyacente, que conduce a hidronefrosis (Nyland y Mattoon, 2002; Fritsch y Gerwing, 1996).

Útero

El cuerpo uterino se observa como una estructura sólida, homogénea e hipoeoica, ubicado entre la vejiga y el colon descendente. La vejiga distendida sirve como punto de orientación y como ventana acústica para localizar y estudiar el cuerpo del útero. Normalmente el endometrio y el miometrio no se pueden diferenciar. Sin embargo, un borde hiperecoico delgado puede evidenciarse periféricamente, permitiendo delimitar dicho órgano. La luz uterina normalmente no se ve, aunque podría ser visible un área central ecogénica brillante correspondiente a una pequeña cantidad de mucus intraluminal [Tabla 1: Foto 3 – 4] (Nyland y Mattoon, 2002; Fritsch y Gerwing, 1996).

La visualización de los cuernos uterinos suele ser dificultosa, debido a que los ecos se pierden entre el intestino delgado y la grasa mesentérica. Sin embargo, puede diferenciarse del intestino por la ausencia de peristaltismo, la ausencia de aire intraluminal y la ausencia del aspecto estratificado (Nyland y Mattoon, 2002).

El cuello uterino se observa como una estructura oblicua hiperecoica lineal en un corte sagital (Nyland y Mattoon, 2002).

Enfermedades del útero

Complejo hiperplasia endometrial quística – piómetra

Los hallazgos ecográficos incluyen un aumento del tamaño del cuerpo y cuernos uterinos, el diámetro puede ser de algunos milímetros o llegar a medir varios centímetros. Por lo general el aumento puede ser simétrico, segmental o focal. El contenido uterino suele ser homogéneo y anecoico con fuerte refuerzo posterior, o puede ser hipoeecogénico. La pared uterina puede presentar un aspecto variable, de lisa a irregular, de delgada a gruesa o presentar variaciones segmentales en el grosor. La pared puede visualizarse ecogénica o hipoeecoica. Dentro del endometrio engrosado pueden visualizarse focos anecoicos que representan las glándulas quísticas dilatadas [Tabla 1: Foto 5 – 8] (Nyland y Mattoon, 2002; Fritsch y Gerwing, 1996).

Hidrómetra – Mucómetra – Hemómetra

La hidrómetra se caracteriza por contenido anecoico, mientras que la mucómetra y la hemómetra se caracterizan por contenido ecogénico, siendo difícil diferenciar ecográficamente el mucus de la sangre (Nyland y Mattoon, 2002; Fritsch y Gerwing, 1996).

Neoplasias uterinas

Las neoplasias uterinas suelen visualizarse como masas homogéneas e hipoeecogénicas, aunque en ocasiones puede presentar áreas hipereecogénicas y ser difusamente heterogéneas (Nyland y Mattoon, 2002; Fritsch y Gerwing, 1996).

Es importante destacar que para llegar al diagnóstico definitivo se requiere un estudio histopatológico, por lo tanto se deben obtener muestras por medio de una biopsia ecoguiada o una laparatomía exploratoria.

Diagnóstico de gestación en la perra y la gata

El diagnóstico de gestación mediante ultrasonografía puede realizarse a partir del día 23 luego del primer día del diestro citológico en la perra. Mientras que en la gata a partir de los 18-20 días después del servicio (Nyland y Mattoon, 2002; Zambelli y Prati, 2006; Nelson y Couto, 2000).

El primer signo que confirma la preñez es la detección de un saco gestacional. El saco gestacional es anecoico, mide sólo algunos milímetros de diámetro, contiene líquido coriónico, y está rodeado por una pared hiperecogénica delgada, el trofoblasto. El tejido uterino que rodea el saco gestacional se vuelve más grueso localmente y es hiperecogénico en relación al tejido uterino adyacente [Tabla 2: Foto 1 – 3] (Nyland y Mattoon, 2002).

Entre los 23 y 25 días de gestación, el embrión se observa como una estructura ecogénica oblonga de varios milímetros de longitud, situado excéntricamente dentro del saco gestacional esférico. El saco gestacional está rodeado por una delgada capa interna del útero, periférica e hiperecogénica, la placenta en desarrollo. La placenta zonal visible se puede reconocer entre los 27 y 30 días como un engrosamiento focal cilíndrico, haciéndose evidente hacia el día 36. Entre los 25 y 28 días el embrión se aleja de la pared uterina manteniéndose unido a ella por la membrana del saco vitelino. La membrana del saco vitelino se observa como una estructura ecogénica lineal inicialmente con forma de U, cambiando a una estructura tubular entre los 27 y 31 días (Nyland y Mattoon, 2002).

Mientras que la detección del saco gestacional es diagnóstica de gestación, la visualización de la actividad cardíaca y más adelante, de movimiento fetal es indicativa de viabilidad fetal. La actividad cardíaca se detecta entre los 23 y 25 días. Se identifica como un pequeño foco de ecos que palpan rápidamente dentro del embrión. Esto ocurre antes de que se aprecien las estructuras anatómicas reconocibles macroscópicamente. La frecuencia cardíaca del feto es aproximadamente el doble de la frecuencia materna. El aumento de la frecuencia cardíaca fetal en respuesta al estrés es un signo positivo, que indica vigor fetal. El movimiento fetal se observa a partir de los 33 y 35 días de gestación [Tabla 2: Foto 4 – 5] (García Mitacek, 2013; Nyland y Mattoon, 2002).

El desarrollo fetal progresa rápidamente a partir del día 30, pudiendo reconocerse la organogénesis. La orientación fetal se puede reconocer en forma precisa, con la observación de la cabeza y el cuerpo hacia el día 28 (Tabla 2: Foto 6). Dentro de la cabeza hay un foco inicial anecoico, seguido por el desarrollo, durante la siguiente semana, del plexo coroideo ecogénico bilobulado, rodeando por un ventrículo cerebral anecoico. Los esbozos de las extremidades y el movimiento fetal se reconocen hacia el día 35. El esqueleto fetal se puede identificar entre los 33 y 39 días observándose como una estructura hiperecogénica con sombras acústicas. Primero se detecta la cabeza, seguida de una rápida mineralización de la espina dorsal torácica y las costillas, luego la espina dorsal cervical y el esqueleto apendicular. La vejiga urinaria y el estómago son los primeros órganos abdominales que se identifican ecográficamente y aparecen como áreas anecoicas focales entre los 35 y 39 días. Debido a que el estómago y la vejiga urinaria se llenan y se vacían, se pueden observar varios grados de distensión pudiendo cambiar durante el curso de la exploración (García Mitacek, 2013; Nyland y Mattoon, 2002).

Se ha demostrado que el pulmón cambia de ecogenicidad durante el desarrollo. El pulmón y el hígado son relativamente isoecogénicos cuando se observan inicialmente, sin una definición

clara entre ellos. La orientación fetal se determina por la situación del corazón, el estómago y la vejiga [Tabla 2: Foto 7 – 9]. A medida que el feto se desarrolla, entre los 38 y 42 días, los pulmones se vuelven hiperecogénicos con relación al hígado. Los riñones y los ojos se observan entre los 39 y 47 días [Tabla 2: Foto 13]. Los riñones son hiperecogénicos con pelvis prominentes y anecoicas. Con el tiempo se pueden diferenciar la corteza y la médula renal, y la pelvis se vuelve menos dilatada. El corazón es hipoecogénico o anecoico, con ecos lineales septados que representan las paredes de las cámaras y válvulas cardíacas. El día 40 pueden visualizarse las cuatro cámaras cardíacas y entre los 57 y 63 días se puede observar el intestino (Nyland y Mattoon, 2002).

La ultrasonografía ha sido utilizada extensamente para el diagnóstico de gestación, sin embargo también puede utilizarse para predecir las fechas de parto, estimar la edad gestacional y evaluar el estrés fetal (Nyland y Mattoon, 2002). A partir de diferentes estudios realizados sobre el control ultrasonográfico de la gestación en la perra y la gata se desarrollaron fórmulas sencillas para ser utilizadas en la predicción de la edad gestacional (Nyland y Mattoon, 2002). Las fórmulas utilizadas para estimar la edad gestacional utilizan mediciones del saco gestacional y fetales, tales como diámetro del saco gestacional, longitud cráneo-caudal, diámetro biparietal y diámetro transversal fetal [Tabla 2: Foto 10 – 12] (Nyland y Mattoon, 2002; Beck y col., 1990; Zambelli y col., 2002; Zambelli y col., 2004; García Mitacek y col., 2012a; García Mitacek, 2013). El desarrollo de estas fórmulas, permite al médico veterinario estimar la edad gestacional, así como también relacionar el crecimiento embrionario-fetal con la edad gestacional. Por lo tanto la información obtenida mediante la ultrasonografía le permite al clínico realizar un manejo racional y controlado del parto, disminuir el riesgo de distocias y aumentar la sobrevivencia neonatal, lo cual resulta de suma utilidad en la clínica reproductiva diaria.

Útero postparto

La ultrasonografía permite controlar el útero postparto y de esta forma evaluar la presencia o ausencia de retención de fetos o membranas placentarias, hemorragias postparto, subinvolución de sitios placentarios y endometritis postparto [Tabla 1: Foto 9 – 10, 17] (Dickie, 2006).

Entre el día 1 y 4 postparto se observa el útero aumentado de tamaño, la pared uterina ecogénica y el contenido uterino anecoico a hipoecoico. Generalmente pueden visualizarse puntos de placentación, los cuales son más grandes que las zonas interplacentarias, por lo que la pared uterina se observa gruesa e irregular. Entre los 8 y 24 días postparto el contenido luminal disminuye y se observa más homogéneo a medida que la involución progresa. Distinguir el contenido luminal de la pared adyacente suele ser difícil, pero el contenido luminal se vuelve hipoecogénico en algunos casos y contrasta bien con el endometrio hiperecogénico

adyacente. El endometrio hiperecogénico esta rodeado por el miometrio hipoecogénico y es más grueso en los punto de placentación comparado con el endometrio interplacentario. Hacia el día 24 del postparto el diámetro uterino disminuye y se pierde la visualización de las capas de la pared uterina (Nyland y Mattoon, 2002; Fritsch y Gerwing, 1996).

Gestación anormal

La ultrasonografía permite detectar varias afecciones que pueden producirse durante la gestación. Éstas incluyen reabsorción embrionaria-fetal, aborto, desarrollo fetal retardado, alteraciones fetales, muerte fetal antes o durante el parto y estrés fetal (Nyland y Mattoon, 2002; Fritsch y Gerwing, 1996).

Los conceptus pequeños o subdesarrollados se reconocen mejor por comparación directa con los conceptus adyacentes. Sin embargo, en muchas ocasiones resulta difícil determinarlo a través de una sola medición. Un estudio desarrollado en gatas gestantes en el cual se realizó un seguimiento ultrasonográfico diario, permitió desarrollar fórmulas para poder determinar con exactitud la edad gestacional a través de mediciones realizadas a los sacos gestacionales y fetos, lo cual le permite al clínico evaluar el desarrollo embrionario-fetal felino (García Mitacek y col., 2012b). Por lo tanto, el seguimiento periódico permite documentar el crecimiento normal a través de las mediciones de los sacos gestacionales o fetales.

La reabsorción embrionaria – fetal se reconoce por una reducción del tamaño embrionario – fetal comparado con los conceptus adyacentes, un cambio en el líquido embrionario de anecoico a hipoecoico, la presencia de partículas ecogénicas y la ausencia de latido cardíaco. El saco gestacional se colapsa y la pared uterina adyacente puede ser relativamente hipoecogénica. Por lo general, estos cambios ocurren rápidamente [Tabla 2: Foto 14] (García Mitacek, 2013; Nyland y Mattoon, 2002).

La muerte fetal puede afectar un feto, varios fetos o a la camada entera. La muerte fetal se reconoce por pérdida de la actividad cardíaca y perdida de movimientos fetales tales como movimientos del cuerpo y extremidades, hipo, etc. Los fetos muertos pierden rápidamente el aspecto ecográfico normal y generalmente son expulsados a las pocas horas [Tabla 2: Foto 15]. Si ocurre retención fetal, después de 1 o 2 días sólo pueden reconocerse estructuras esqueléticas mineralizadas por la hiperecogenicidad y las sombras acústicas. El útero postaborto, luego de la expulsión fetal completa, presenta un aspecto similar al útero postparto (Nyland y Mattoon, 2002). Si el aborto es inducido por medio de la utilización de diferentes protocolos terapéuticos (agonistas dopaminérgicos, prostaglandinas, antiporgestágenos, etc) resulta de suma importancia realizar un seguimiento ultrasonográfico con la finalidad de evaluar la eficacia del tratamiento (Davidson y Baker, 2009a; García Mitacek y col., 2012b; García Mitacek, 2013).

El estrés fetal se diagnostica por una frecuencia cardíaca fetal reducida que es debida a la hipoxia [Tabla 2: Foto 16] (Nyland y Mattoon, 2002; García Mitacek, 2013).

Glándula mamaria

La evaluación ultrasonográfica de la glándula mamaria en perra y gatas resulta útil para identificar lesiones o masas pequeñas, las cuales no pueden ser identificadas por medio de palpación. Así mismo, permite evaluar los ganglios linfáticos relacionados con el drenaje linfático de dichas glándulas (Davidson y Baker, 2009a).

La evaluación ultrasonográfica de la neoplasia mamaria puede ayudar a definir la extensión de la lesión, incluyendo la invasión de la pared corporal. En estos casos es importante evaluar los ganglios linfáticos regionales en busca de un aumento del tamaño o cambios en la ecogenicidad que sugieran metástasis (Nyland y Mattoon, 2002).

Ultrasonografía reproductiva en el perro y el gato

El aparato reproductivo del macho consta de escroto, testículos, epidídimos, conducto deferente, cordón espermático, pene, prepucio y glándulas anexas (glándulas bulbouretrales en el gato, próstata en el gato y perro). La ultrasonografía esta indicada en pacientes con sospecha de enfermedad testicular, epididimaria, de los conductos deferentes y glándulas accesorias, permitiendo evaluar la estructura interna y realizar mediciones de los diferentes órganos (Feldman y Nelson, 2000; Nyland y Mattoon, 2002). Así mismo la ultrasonografía permite tomar muestras eco-guiadas para poder realizar un examen citológico o histopatológico y de esta forma llegar al diagnóstico definitivo (Nyland y Mattoon, 2002; Johnston y col., 2001). En lo que respecta al pene y el prepucio normalmente se evalúan mejor mediante inspección visual directa (Feldman y Nelson, 2000).

Testículos y Epidídimo

El examen ultrasonográfico testicular es un procedimiento sencillo. Los testículos deberían ser ecografiados en un plano longitudinal y transversal. En los perros y los gatos el parénquima testicular es ecogénico con una textura homogénea. El mediastino testicular se aprecia como una estructura lineal, central e hiperecoica en el plano medio longitudinal y como un punto focal central hiperecoico en el plano transversal [Tabla 3: Foto 1 – 2] (Nyland y Mattoon, 2002; Dickie, 2006; Davidson y Baker, 2009b).

La cola del epidídimo es anecoica o menos ecogénica que el parénquima testicular. Mientras que la textura es más densa que la de los testículos. La cabeza y el cuerpo del epidídimo son prácticamente isoecoecogénicos con el parénquima testicular [Tabla 3: Foto 4] (Nyland y Mattoon, 2002; Dickie, 2006). En contraposición, el conducto deferente es difícil de visualizar ecográficamente (Nyland y Mattoon, 2002; Dickie, 2006).

El examen ecográfico del flujo Doppler color en caninos detecta la presencia de una arteria localizada dorsalmente entre los testículos y el epidídimo. Sin embargo, no permite detectar el bajo flujo sanguíneo del parénquima testicular y epididimal, mientras que el Doppler potenciado si permite documentar el flujo sanguíneo (Nyland y Mattoon, 2002; Dickie, 2006).

Enfermedad testicular

El examen ultrasonográfico testicular permite: detectar cambios palpables y no palpables del órgano, localizar testículos ectópicos y diferenciar enfermedades testiculares de epididimales. Sin embargo, debe recordarse, en la mayoría de los casos se requiere un estudio histopatológico para llegar al diagnóstico definitivo (Feldman y Nelson, 2000; Johnston y col., 2001).

Orquitis

La inflamación testicular aguda se visualiza ecográficamente con un patrón difuso, poco uniforme e hipoecoico, puede presentar agrandamiento testicular y esta asociado a un agrandamiento epididimal, en caso de coexistir con una epididimitis.

En ciertas ocasiones pueden observarse abscesos, los cuales se caracterizan por una pared irregular e hipoecoica y contenido central anecoico a hipoecoico.

En las inflamaciones crónicas el parénquima testicular es hiperecoico o presenta una ecogenicidad mixta. Así mismo, puede observarse una reducción del tamaño testicular (Nyland y Mattoon, 2002; Dickie, 2006; Davidson y Baker, 2009b).

Testículo ectópico

Para poder evidenciar los testículos ectópicos se debe realizar una ecografía abdominal que abarque desde el canal inguinal hasta el polo caudal de los riñones. El testículo ectópico es hipoecoico y presenta un tamaño menor que el testículo ubicado escrotalmente, sin embargo conserva el mediastino testicular hiperecoico, lo que permite identificar el testículo retenido (Nyland y Mattoon, 2002; Dickie, 2006; Davidson y Baker, 2009b).

Atrofia testicular

Los testículos atrofiados se caracterizan ultrasonográficamente por conservar la misma ecogenicidad o ser levemente hipoecoicos en relación al parénquima testicular normal. Así mismo, se observa una reducción de su tamaño (Nyland y Mattoon, 2002; Dickie, 2006; Davidson y Baker, 2009b).

Torsión testicular

Ecográficamente la torsión testicular se caracteriza por un agrandamiento testicular y un parénquima difuso, hipoecoico, acompañado de agrandamiento epididimal, del cordón espermático y engrosamiento escrotal. Sin embargo, se requiere realizar una examinación mediante Doppler, la que revela un flujo sanguíneo aberrante, y permite confirmar la torsión testicular (Nyland y Mattoon, 2002; Dickie, 2006; Davidson y Baker, 2009b).

Neoplasias testiculares

La apariencia ultrasonográfica de los tumores testiculares varía y no es específica del tipo de tumor. Las lesiones grandes presentan un patrón parenquimal mixto o complejo que puede ser secundario a necrosis y hemorragia. Los tumores pueden causar agrandamiento testicular generalizado, obliteración del mediastino testicular y del epidídimo [Tabla 3: Foto 3] (Nyland y Mattoon, 2002; Dickie, 2006).

La detección de una anomalía testicular compatible con una neoplasia, implica realizar un examen ultrasonográfico de los órganos abdominales con la finalidad de visualizar lesiones metastásicas (Nyland y Mattoon, 2002; Dickie, 2006).

Hidrocele

En caninos el hidrocele se visualiza ultrasonográficamente como una colecta anecoica alrededor del testículo, y una zona de ecos brillantes por detrás que se corresponde al refuerzo acústico posterior (Feldman y Nelson, 2000).

Epididimitis

La epididimitis se caracteriza por un agrandamiento del epidídimo con patrón parenquimatoso ecogénico mixto o hipoecoico difuso (Feldman y Nelson, 2000).

Quiste epididimario

Como toda estructura quísticas se observa un área focal anecoica con una pared interna definida y refuerzo acústico posterior (Feldman y Nelson, 2000).

Escroto

El examen ultrasonográfico permite diferenciar enfermedades escrotales de testiculares. La enfermedad escrotal generalmente se visualiza con un patrón isoeoico a hiperecoico comparado con los testículos (Nyland y Mattoon, 2002; Dickie, 2006).

Glándula Prostática

La evaluación de la próstata canina y felina se realiza a través de una ecografía transabdominal. La vejiga con una moderada distensión facilita la orientación de la glándula y además permite desplazar la próstata hacia craneal. Una vez localizada la vejiga, se debe realizar una exploración hacia caudal a través del seguimiento de la uretra hasta localizar los lóbulos prostáticos. Una vez identificada la glándula se debe examinar el órgano en el plano longitudinal y transversal. En el plano longitudinal se visualiza adyacente al cuello de la vejiga, pudiendo observarse los dos lóbulos prostáticos separados por la uretra. Mientras que la imagen transversal de la próstata se obtiene rotando el transductor 90 grados, pudiendo observarse dos lóbulos con la uretra ubicada centralmente, dando como resultado una imagen con aspecto de alas de mariposa. Los márgenes de la glándula suelen estar bien definidos por una cápsula delgada y ecogénica [Tabla 3: Foto 5] (Nyland y Mattoon, 2002; Fritsch y Gerwing, 1996; Dickie, 2006).

La uretra prostática se visualiza en posición central dorsal o ventral de la glándula, la misma puede ser observada en el corte longitudinal como una estructura hipoecoica y el plano transversal como un área redonda hipoecoica entre los dos lóbulos prostáticos (Nyland y Mattoon, 2002; Fritsch y Gerwing, 1996; Dickie, 2006).

El aspecto ecográfico de la próstata canina varía con la edad y con la condición de entero o castrado. El parénquima prostático normal en un perro entero joven o adulto castrado es homogéneo con una textura de media a fina. La ecogenicidad es variable, de hiperecoica a hipoecoica, aunque la ecogenicidad moderada es la más común. Mientras que los perros enteros adultos el parénquima continúa siendo homogéneo e hiperecoico, pero la textura pasa a ser media a gruesa, así como también se observa un incremento del tamaño de la glándula (Nyland y Mattoon, 2002; Fritsch y Gerwing, 1996; Dickie, 2006; Davidson y Baker, 2009b).

La próstata felina suele ser difícil de visualizar por su tamaño pequeño, presentando las mismas particularidades ecográficas que la próstata canina (Nyland y Mattoon, 2002; Fritsch y Gerwing, 1996).

Enfermedad prostática

Hiperplasia prostática benigna

Se visualiza un agrandamiento generalizado de la glándula, generalmente hay pérdida del aspecto bilobulado y no se visualiza la cápsula. Así mismo, puede observarse la uretra prostática dilatada. La ecogenicidad del parénquima prostático puede ser normal o estar aumentada [Tabla 3: Foto 5 – 6] (Nyland y Mattoon, 2002; Fritsch y Gerwing, 1996; Dickie, 2006).

Prostatitis

La prostatitis aguda se manifiesta con signos clínicos bien definidos. Sin embargo, ultrasonográficamente pueden observarse discretas variaciones, como un mínimo aumento de tamaño y una leve disminución de la ecogenicidad de la glándula (Fritsch y Gerwing, 1996).

Al evolucionar a una prostatitis crónica se observan cambios muchas veces asociados a enfermedad subyacente como por ejemplo hiperplasia prostática benigna. La apariencia del parénquima suele ser heterogénea, con un patrón mixto de ecogenicidad variable, pudiendo visualizarse áreas focales o multifocales, hipoeecogénicas o hipereecogénicas. En ciertas ocasiones pueden observarse quistes de tamaño variable o abscesos. La cápsula de la glándula suele estar intacta. Concomitantemente, suele observarse linfopatía regional asociada a inflamación (Jhonston y col., 2001, Nyland y Mattoon, 2002; Fritsch y Gerwing, 1996; Dickie, 2006).

Neoplasias

Una gran variedad de imágenes ecográficas se asocia a ocurrencia de neoplasia. Generalmente se visualiza un agrandamiento glandular, la glándula suele tomar un aspecto irregular y textura heterogénea. Pueden visualizarse focos heterogéneos, hiperecoicos o hipoecoicos. Así mismo, la glándula presenta un contorno irregular o pierde el aspecto bilobulado (Nyland y Mattoon, 2002; Fritsch y Gerwing, 1996; Dickie, 2006).

Es importante destacar que para llegar al diagnóstico definitivo se requiere un estudio histopatológico, por lo tanto se deben obtener muestras por medio de una biopsia eco-guiada o una laparatomía exploratoria (Feldman y Nelson, 2000; Nyland y Mattoon, 2002; Fritsch y Gerwing, 1996; Dickie, 2006).

Calcificaciones prostáticas

En el parénquima prostático pueden observarse con relativa frecuencia áreas hiperecogénicas de tamaño variable y de contorno liso o irregular, con sombra acústica. Estos hallazgos corresponden histológicamente a zonas de fibrosis o metaplasia que pueden estar calcificadas, observándose en las prostatitis crónicas o en relación a neoplasias prostáticas (Fritsch y Gerwing, 1996).

Quistes

Los quistes generalmente están asociados a hiperplasia, prostatitis o neoplasias. Los quistes se caracterizan por tener contenido anecoico rodeados de una pared delgada hiperecoica con refuerzo acústico posterior y pueden variar en tamaño y cantidad. Si los quistes son pequeños y numerosos el parénquima se visualiza hiperecoico y de forma difusa. Sin embargo, generalmente son de tamaño variable, pudiendo medir unos pocos milímetros hasta varios centímetros de diámetro y presentar forma redondeada, ovalada o irregular (Nyland y Mattoon, 2002; Fritsch y Gerwing, 1996).

Quiste paraprostático

El quiste paraprostático puede estar unido a la próstata por un tallo delgado o por gruesas adhesiones fibrosas. El mismo puede presentar comunicación directa con la glándula prostática o la uretra (Nyland y Mattoon, 2002; Fritsch y Gerwing, 1996).

En el examen ultrasonográfico presenta un aspecto similar a la vejiga, por lo que se lo conoce como “signo de doble vejiga”. Se visualiza como una estructura anecoica, con una pared de grosor variable. El contenido puede tener ecogenicidades focales, las cuales pueden presentar un movimiento arremolinado. El tamaño suele ser variable y pueden adquirir una forma bilobulada (Nyland y Mattoon, 2002; Fritsch y Gerwing, 1996; Davidson y Baker, 2009b).

Distopías prostáticas

Si bien la próstata puede presentar ubicación variable como se mencionó anteriormente, también pueden producirse desplazamiento de la glándula hacia caudal en casos de hernias perineales. Si la próstata se ubica en el interior de la hernia el transductor debe colocarse en la región paraanal, pudiendo identificarla fácilmente en cortes longitudinales y transversales (Fritsch y Gerwing, 1996).

Bibliografía

- Beck, KA.; Baldwin, CJ.; Bosu, WTK. (1990). "Ultrasound prediction of parturition in queens". *Veterinary Radiology*. (31) pp. 32-35.
- Davidson, AP.; Baker, TW. (2009a). "Reproductive ultrasound of the bitch and queen". *Top Companion Anim Med*. 24 (2) pp. 55-63.
- Davidson, AP.; Baker, TW. (2009b). "Reproductive ultrasound of the dog and tom". *Top Companion Anim Med*. 24 (2) pp. 64-70.
- Dickie Alison. (2006). *"Imaging of the reproductive tract"*. En: Mannion Paddy. *Diagnostic ultrasound in small animal practice*. (p. 145-169). Oxford, UK.
- England, GC.; Allen, WE. (1989). "Real-time ultrasonic imaging of the ovary and uterus of the dog". *J Reprod Fertil Suppl*. (39) pp. 91-100.
- Feldman, EC.; Nelson, RW. (2000). "Endocrinología y reproducción en perros y gatos". 2da Edición. (pp. 806-836, 1038-1064). México, Mc Graw-Hill Interamericana.
- Fritsch, Rudolf.; Gerwing Martin. (1996). *Ecografía de perros y gatos*. Acribia editorial, Zaragoza, España.
- García Mitacek, MC.; Praderio, RG.; Bonaura, MC.; de la Sota, RL.; Stornelli, MA. (2012a). "Relación entre parámetros ultrasonográficos y edad gestacional en la gata doméstica". *Analecta Veterinaria*. 32 (2) pp. 5-10.
- García Mitacek, MC.; Stornelli, MC.; Praderio, R.; Stornelli, MA.; de la Sota RL. (2012b). "Efficacy of use of cloprostenol or aglepristone at 21-22 and 35-38 days of gestation for pregnancy termination in queens". *Reprod. Domest. Anim*. 47 (6) pp. 200-203.
- García Mitacek, MC. (2013). *Efecto de cloprostenol y aglepristone sobre la gestación temprana y media en felinos. Estudios clínicos, endocrinológicos y ultrasonográficos*. Tesis Doctoral. FCV. UNLP.
- Johnston, SD.; Root Kustritz, MV.; Olson, PNS. (2001). "Canine and feline theriogenology". (pp. 389-495; 312-331) Philadelphia, London, New York, St. Louis, Sydney, Toronto: W.B. Saunders Company.
- Nyland, TG.; Mattoon, JS. (2002). *"Ovarios y útero"*. En: Nyland TG, Mattoon JS. *Diagnóstico ecográfico en pequeños animales*. 2da. Edición, Barcelona, España. Ed. W.B.S. Company. pp. 240-259.
- Zambelli, D.; Castagnetti, C.; Belluzzi, S.; Bassi, S. (2002). "Correlation between the age of the conceptus and various ultrasonographic measurements during the first 30 days of pregnancy in domestic cats (*Felis catus*)". *Theriogenology*. (57) pp. 1981-1987.
- Zambelli, D.; Castagnetti, C.; Belluzzi, S.; Paladini, C. (2004). "Correlation between fetal age and ultrasonographic measurements during the second half of pregnancy in domestic cats (*Felis catus*)". *Theriogenology*. (67) pp. 1430-1437.
- Zambelli, D.; Prati F. (2006). "Ultrasonography for pregnancy diagnosis and evaluation in queens". *Theriogenology*. 66(1) pp. 135-44.

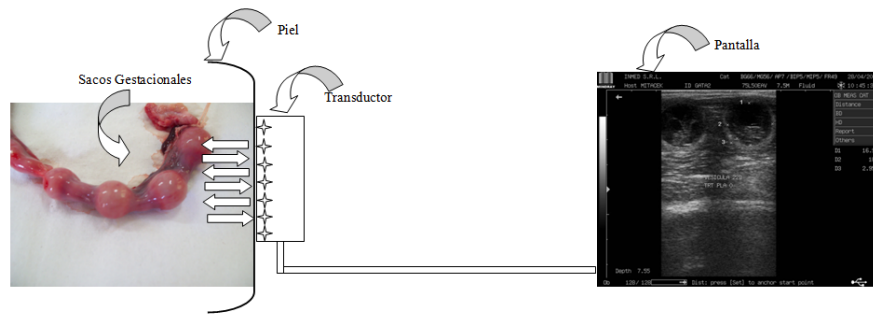


Figura 1: Diagnóstico ultrasonográfico. Principio pulso – eco

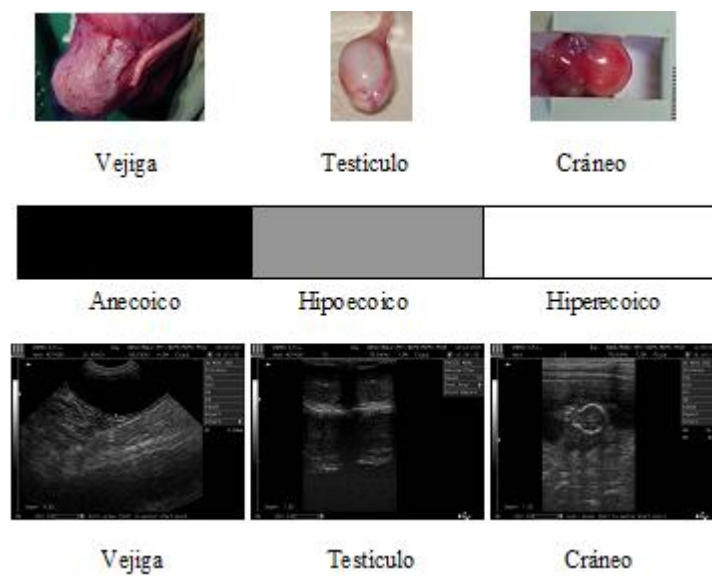


Figura 2: Diferentes órganos e imágenes ultrasonográficas. Terminología

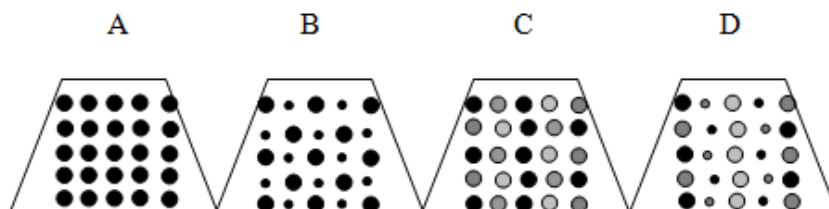
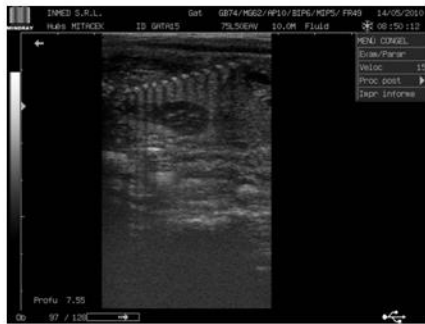


Figura 3: Textura y ecogenicidad. A: Textura y ecogenicidad homogénea. B: Textura heterogénea y ecogenicidad homogénea. C: Textura homogénea y ecogenicidad heterogénea. D: Textura y ecogenicidad heterogénea

MODO B



MODO M/B

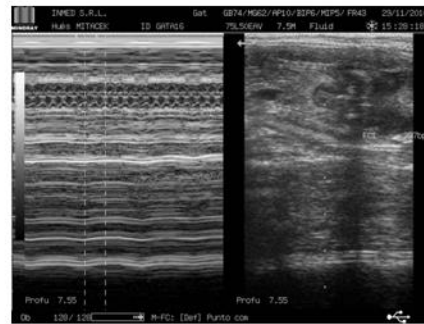
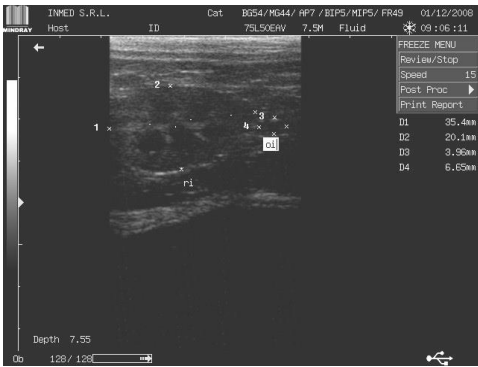
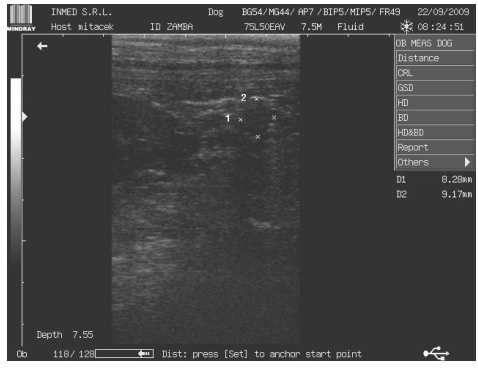

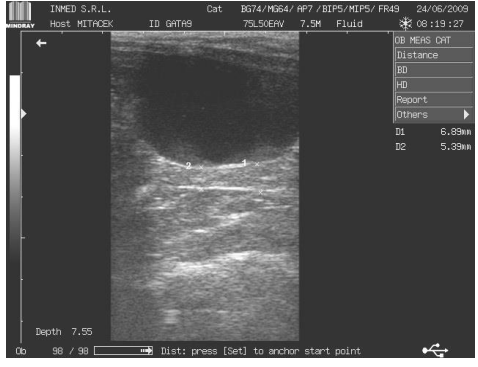


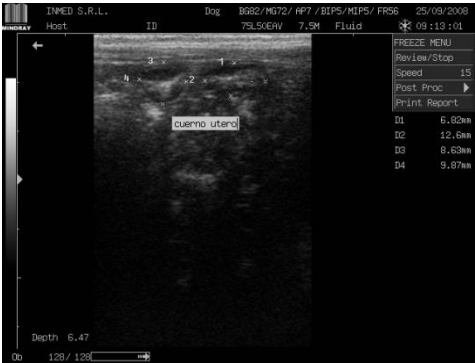


Figura 4: Modo de presentación ecográfica. Modo B y modo M/B. Imagen ultrasonográfica de tórax de fetos felinos de 45 días de gestación

Tabla 1: Imágenes ultrasonográficas en perras y gatas

FOTO N°	IMAGEN ULTRASONOGRÁFICA	DESCRIPCIÓN
1		<p>Especie: Gata</p> <p>Transductor: 7.5 MHz</p> <p>Modo: B</p> <p>D1 x D2: Riñón</p> <p>D3 x D4: Ovario</p>
2		<p>Especie: Perra</p> <p>Transductor: 7.5 MHz</p> <p>Modo: B</p> <p>D1 x D2: Ovario</p>
3		<p>Especie: Perra</p> <p>Transductor: 7.5 MHz</p> <p>Modo: B</p> <p>Útero Normal</p> <p>D1: Cuerpo Uterino</p> <p>D2: Cuerno Uterino</p>
4		<p>Especie: Gata</p> <p>Transductor: 7.5 MHz</p> <p>Modo: B</p> <p>Útero Normal</p> <p>D1: Cuello Uterino</p> <p>D2: Cuerpo Uterino</p>

Continuación Tabla 1: Imágenes ultrasonográficas en perras y gatas

FOTO N°	IMAGEN ULTRASONOGRÁFICA	DESCRIPCIÓN
5		<p>Especie: Gata</p> <p>Transductor: 5 MHz</p> <p>Modo: B</p> <p>Complejo Hiperplasia Endometrial Quística – Piómetra: D1 xD2: Corte transversal cuerno uterino</p>
6		<p>Especie: Gata</p> <p>Transductor: 5 MHz</p> <p>Modo: B</p> <p>Complejo Hiperplasia Endometrial Quística – Piómetra: Corte longitudinal</p>
7		<p>Especie: Perra</p> <p>Transductor: 7.5 MHz</p> <p>Modo: B</p> <p>Complejo Hiperplasia Endometrial Quística – Piómetra: D1 x D2: Corte transversal cuerno uterino D3 x D4: Corte transversal cuerno uterino</p>

8



Especie: Perra

Transductor: 7.5 MHz


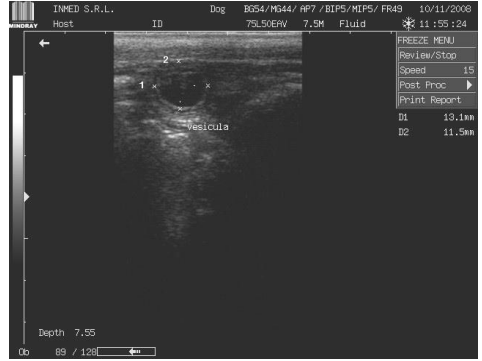

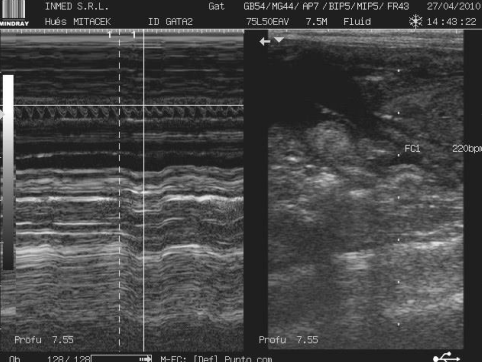
Modo: B

Complejo Hiperplasia
Endometrial Quística –
Piómetra:D1: Corte longitudinal cuerno
uterino

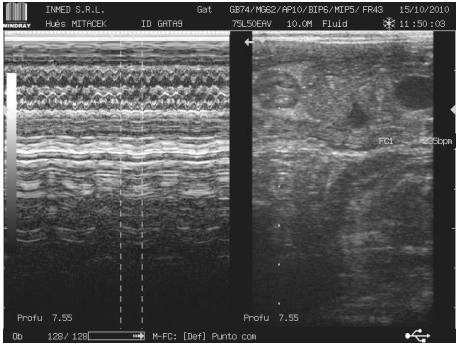



Continuación Tabla 1: Imágenes ultrasonográficas en perras y gatas

FOTO N°	IMAGEN ULTRASONOGRÁFICA	DESCRIPCIÓN
9		<p>Especie: Gata</p> <p>Transductor: 7.5 MHz</p> <p>Modo: B</p> <p>Útero Postparto</p> <p>D1: Cuerpo Uterino</p> <p>D2: Cuerno Uterino</p>
10		<p>Especie: Perra</p> <p>Transductor: 5 MHz</p> <p>Modo: B</p> <p>Útero Postparto</p> <p>D1: Cuerno Uterino</p>

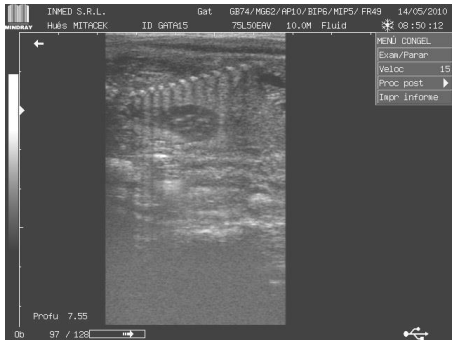
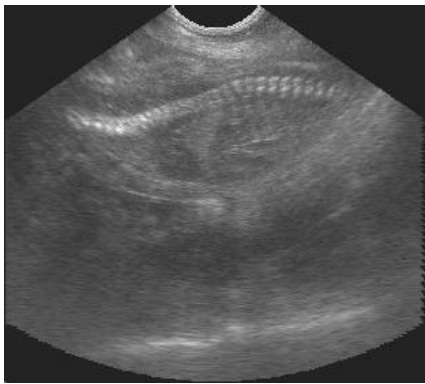


Tabla 2: Imágenes ultrasonográficas de gestación en perras y gatas

FOTO N°	IMAGEN ULTRASONOGRÁFICA	DESCRIPCIÓN
1	 The image shows a single, circular gestational sac with a dark center, surrounded by a lighter, echogenic ring. The background is dark. Text at the top includes 'INMED S.R.L.', 'Host MITRACK', 'ID GATA', 'Cat', 'B654/M644/ RPT /BIPS/MIPS/ FR49', '7.5M', 'Fluid', and '05/11/2008'. A menu on the right lists 'OB MEAS CAT', 'Distance', 'BD', 'HD', 'Report', and 'Others'. At the bottom, it says 'Depth 7.55' and 'Ob 128 / 128'.	<p>Especie: Gata</p> <p>Transductor: 7.5 MHz</p> <p>Modo: B</p> <p>Saco gestacional de 20 días de gestación</p>
2	 The image shows a gestational sac labeled 'Vesicula' with a dark center. There are some small white specks around it. Text at the top includes 'INMED S.R.L.', 'Host', 'ID', 'Dog', 'B654/M644/ RPT /BIPS/MIPS/ FR49', '7.5M', 'Fluid', and '10/11/2008'. A menu on the right lists 'FREEZE MENU', 'Rev/iew/Stop', 'Speed 15', 'Post Proc', 'Print Report', 'D1 13.1mm', and 'D2 11.5mm'. At the bottom, it says 'Depth 7.55' and 'Ob 88 / 128'.	<p>Especie: Perra</p> <p>Transductor: 7.5 MHz</p> <p>Modo: B</p> <p>Saco gestacional de 24 días de gestación</p>
3	 The image shows two side-by-side ultrasound views of a gestational sac. The left view is a transverse section (D1) and the right view is a longitudinal section (D5). Both show a dark center with some internal structure. Text at the top includes 'INMED S.R.L.', 'Host MITRACK', 'ID GATINA', 'Cat', 'B654/M644/ RPT /BIPS/MIPS/ FR49', '7.5M', 'Fluid', and '11/05/2008'. A menu on the right lists 'D1 26.4mm', 'D2 17.4mm', 'D3 7.4mm', 'D4 17.3mm', and 'D5 17.3mm'. At the bottom, it says 'Depth 7.55' and 'Ob 128 / 128'.	<p>Especie: Gata</p> <p>Transductor: 7.5 MHz</p> <p>Modo: B/B</p> <p>Saco gestacional de 24 días de gestación</p> <p>D1: Corte Transversal</p> <p>D5: Corte Longitudinal</p>
4	 The image shows two side-by-side ultrasound views of a fetus. The left view is a longitudinal section showing the spine and ribs. The right view shows a fetal heart rate measurement of 220 bpm. Text at the top includes 'INMED S.R.L.', 'Host MITRACK', 'ID GATIN2', 'Cat', 'B654/M644/ RPT /BIPS/MIPS/ FR49', '7.5M', 'Fluid', and '27/04/2010'. At the bottom, it says 'Profu 7.55' and 'Ob 128 / 128'.	<p>Especie: Gata</p> <p>Transductor: 7.5 MHz</p> <p>Modo: M/B</p> <p>Feto de 43 días de gestación</p> <p>Frecuencia cardíaca: 220 lpm</p>




Continuación Tabla 2: Imágenes ultrasonográficas de gestación en perras y gatas

FOTO N°	IMAGEN ULTRASONOGRÁFICA	DESCRIPCIÓN
5		<p>Especie: Gata</p> <p>Transductor: 7.5 MHz</p> <p>Modo: M/B</p> <p>Feto de 53 días de gestación</p> <p>Frecuencia cardíaca: 235 lpm</p>
6		<p>Especie: Gata</p> <p>Transductor: 7.5 MHz</p> <p>Modo: B</p> <p>Feto de 38 días de gestación</p>
7		<p>Especie: Gata</p> <p>Transductor: 10 MHz</p> <p>Modo: B</p> <p>Feto de 53 días de gestación</p> <p>Tórax – Abdomen</p>
8		<p>Especie: Gata</p> <p>Transductor: 7.5 MHz</p> <p>Modo: B</p> <p>Feto de 60 días de gestación</p> <p>Abdomen</p>

Continuación Tabla 2: Imágenes ultrasonográficas de gestación en perras y gatas

FOTO N°	IMAGEN ULTRASONOGRÁFICA	DESCRIPCIÓN
9		<p>Especie: Gata</p> <p>Transductor: 7.5 MHz</p> <p>Modo: B</p> <p>Feto de 60 días de gestación</p> <p>Tórax</p>
10		<p>Especie: Gata</p> <p>Transductor: 7.5 MHz</p> <p>Modo: B</p> <p>Feto de 60 días de gestación</p> <p>Longitud cráneo-caudal</p>
11		<p>Especie: Gata</p> <p>Transductor: 7.5 MHz</p> <p>Modo: B</p> <p>Feto de 40 días de gestación</p> <p>D1: Diámetro biparietal</p>
12		<p>Especie: Gata</p> <p>Transductor: 7.5 MHz</p> <p>Modo: B</p> <p>Feto de 47 días de gestación</p> <p>D1: Diámetro transverso abdominal</p>

Continuación Tabla 2: Imágenes ultrasonográficas de gestación en perras y gatas

FOTO N°	IMAGEN ULTRASONOGRÁFICA	DESCRIPCIÓN
13		<p>Especie: Gata</p> <p>Transductor: 7.5 MHz</p> <p>Modo: B</p> <p>Feto de 60 días de gestación</p> <p>Cabeza – Ojos</p>
14		<p>Especie: Gata</p> <p>Transductor: 7.5 MHz</p> <p>Modo: B</p> <p>D1x D2: Saco gestacional - Reabsorción</p> <p>D3: Pared del saco gestacional</p>
15		<p>Especie: Gata</p> <p>Transductor: 10 MHz</p> <p>Modo: B</p> <p>Feto momificado</p>

Continuación Tabla 2: Imágenes ultrasonográficas de gestación en perras y gatas


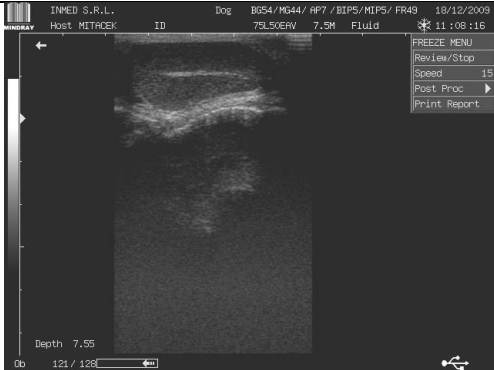

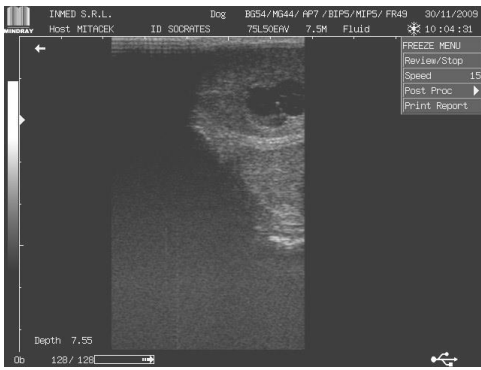




FOTO N°	IMAGEN ULTRASONOGRÁFICA	DESCRIPCIÓN
17		<p>Especie: Perra</p> <p>Transductor: 7.5 MHz</p> <p>Modo: B</p> <p>Retención placentaria</p>

Tabla 3: Imágenes ultrasonográficas de perros

FOTO N°	IMAGEN ULTRASONOGRÁFICA	DESCRIPCIÓN
1		<p>Especie: Perro</p> <p>Transductor: 7.5 MHz</p> <p>Modo: B</p> <p>Testículo: Corte longitudinal</p>
2		<p>Especie: Perro</p> <p>Transductor: 7.5 MHz</p> <p>Modo: B</p> <p>Testículo: Corte transversal</p>
3		<p>Especie: Perro</p> <p>Transductor: 7.5 MHz</p> <p>Modo: B</p> <p>Testículo: Neoformación</p>
4		<p>Especie: Perro</p> <p>Transductor: 7.5 MHz</p> <p>Modo: B</p> <p>Testículo</p> <p>D1 x D2: Cola de epidídimo</p>

Continuación Tabla 3: Imágenes ultrasonográficas de perros y gatos

FOTO N°	IMAGEN ULTRASONOGRÁFICA	DESCRIPCIÓN
5		<p>Especie: Perro</p> <p>Transductor: 7.5 MHz</p> <p>Modo: B</p> <p>Próstata: Corte longitudinal</p>
6		<p>Especie: Perro</p> <p>Transductor: 7.5 MHz</p> <p>Modo: B</p> <p>Hiperplasia Prostática</p> <p>Benigna: Corte longitudinal</p>
7		<p>Especie: Perro</p> <p>Transductor: 7.5 MHz</p> <p>Modo: B</p> <p>Hiperplasia Prostática</p> <p>Benigna: Corte trasversal</p>

PARTE IV

Congelación de semen e inseminación artificial

María Candela Bonaura, María Alejandra Stornelli



CAPITULO 15

Efecto del proceso de criopreservación sobre la fertilidad seminal

María Alejandra Stornelli

La criopreservación de semen y la utilización del semen congelado mediante inseminación artificial ha causado un gran impacto sobre la reproducción animal y humana. Innumerables crías de diferentes especies han nacido a partir del uso de semen congelado. Sin embargo constantemente se modifican los protocolos de congelación a fin de obtener mejores resultados en relación a la supervivencia espermática y fertilidad del semen al descongelado. Para lograr estos objetivos es necesario comprender a que tipo de estrés se ven sometidos los espermatozoides durante los procesos de congelación y descongelación así como la manera en que las células responden a las agresiones fisicoquímicas medioambientales.

Mediante la criopreservación es posible detener el proceso que sufre el espermatozoide desde la eyaculación hasta la fecundación y conservarlo en el tiempo potencialmente fértil (Watson, 1995). Crister (Crister y col, 1981) observó que los espermatozoides descongelados móviles, con membranas intactas no mantenían su viabilidad y capacidad fecundante durante tanto tiempo como los espermatozoides del semen fresco. Estas observaciones se relacionan con los cambios semejantes a la capacitación, inducidos por los procesos de congelación en la célula espermática. Durante la congelación y descongelación se producen alteraciones celulares que causan reducción de la fertilidad del semen criopreservado en comparación con el semen fresco. Esta reducción de la fertilidad se relaciona tanto con la muerte de las células que no soportan la injuria del proceso de congelación y descongelación, como con la disfunción

no letal instaurada en una parte de la población sobreviviente. (Watson, 2000). Un aumento de las tasas de concepción puede lograrse mejorando los métodos de criopreservación tratando de prevenir o minimizar la ocurrencia de los eventos que desestabilizan las membranas y mejorando la calidad de los espermatozoides sobrevivientes (Watson, 1995; Watson, 2000).

Diversos factores están implicados en las bajas tasas de concepción logradas mediante el uso de semen congelado en comparación con el semen fresco. Un factor de suma importancia es la calidad de semen obtenida al descongelado. Múltiples factores afectan la sobrevivencia de los espermatozoides al descongelado: la metodología de congelación y descongelación, la concentración espermática en el diluyente, el envasado, la composición del diluyente empleado.

Durante el proceso de congelación-descongelación se pierde aproximadamente el 50% de la población inicial de espermatozoides debido a los efectos de la criopreservación sobre las membranas, citoesqueleto, aparato motor y núcleo del espermatozoide (Watson, 1995; Mazur, 1970; Parks y Graham, 1992). Se considera que el principal sitio de daño asociado a los cambios de temperatura son las membranas espermáticas (Watson, 1995). La reducción de la fertilidad asociada al semen congelado es atribuida en gran parte a la alteración de la estructura y función de las membranas durante los procesos de refrigeración, congelación y descongelación (Mazur, 1970; Mazur y col, 1972). Para poder interactuar con el oocito, los espermatozoides deben estar vivos, móviles y poseer la membrana plasmática y acrosomal intactas y funcionales.

La pérdida espermática ocurrida durante la criopreservación puede compensarse en parte mediante la inseminación artificial (IA) de un gran número de espermatozoides, o mediante la colocación del semen en la porción craneal del tracto reproductivo. En el primer caso, al colocar un número mayor de espermatozoides totales contaríamos con un mayor número de espermatozoides que han sobrevivido viables luego de soportar las injurias ocurridas durante la congelación -descongelación (Mazur y col, 1972). Así mismo si no aumentamos la dosis inseminante pero colocamos mediante IA quirúrgica el semen en la porción craneal del tracto reproductivo podremos lograr un aumento de la fertilidad. Esta mejora de la fertilidad puede entenderse si recordamos los eventos necesarios para la fecundación. Debe haber un número suficiente de espermatozoides competentes capaces de realizar la fertilización en el período de tiempo en el cual existen óvulos fértiles capaces de ser fecundados. El isthmus del oviducto actúa como un reservorio funcional de espermatozoides brindando una fuente de potenciales espermatozoides fertilizadores durante este período. (Hunter, 1984). Solo una pequeña parte de los espermatozoides depositados en el tracto genital distal de la hembra llega al reservorio oviductal, la mayoría es expulsado a través de la vulva o fagocitado en el aparato genital femenino. En la ampolla oviductal en el momento de la fertilización, el ratio espermatozoide-oocito es aproximadamente 1 (Hunter, 1996). La competencia numérica y temporal de estos espermatozoides depende tanto del número como de la calidad de espermatozoides introducidos en el tracto genital distal. Cuando la calidad o el número de espermatozoides

inseminados no es óptima, la disponibilidad de espermatozoides potencialmente fértiles es escasa y la fertilidad se ve reducida (Amann y Hammerdted, 1993; Dumbbar, 1983).

Si el número total de espermatozoides funcionales, en una IA con semen congelado cae por debajo del número necesario para lograr una alta probabilidad de fertilización, entonces la fertilidad se ve afectada. Cuando la AI es realizada en la región proximal del tracto genital se requieren pocos espermatozoides para lograr altas probabilidades de fertilidad ya que muchos sobrevivirán para alcanzar el oviducto. Este hecho fue evidenciado por Maxwell (Maxwell, 1986) quien demostró que solo 20×10^6 espermatozoides móviles criopreservados son necesarios para lograr un % de fertilidad mayor al 50% realizando IA intrauterina en oveja mientras que se necesita una dosis muy superior al utilizar la IA cervical. Si la IA fue hecha dentro del oviducto se requieren menos de 1×10^6 espermatozoides (Maxwell y col, 1993).

Un factor importante a considerar es la diferente sensibilidad a los procesos de congelación que poseen los espermatozoides de diferentes machos (Chen y col, 1993; Dhami y col, 1992). Muchos estudios experimentales se han realizado utilizando un pool de semen de varios machos, en estos trabajos quedan enmascaradas las diferencias individuales entre machos (Glaub y col, 1976; Cohen y col, 1981; Blach y col, 1989). Estas diferencias son un factor importante en la selección del protocolo de congelación seleccionado para obtener buenos resultados a la descongelación.

La optimización del protocolo de congelación debe contemplar no solo la obtención de un alto número de espermatozoides sobrevivientes sino también la habilidad funcional de esta población.

Factores que afectan la viabilidad espermática durante el proceso de criopreservación

Cuando los espermatozoides son congelados y descongelados se ven sometidos a varios ciclos de deshidratación e hidratación lo que resulta en cambios significativos de volumen. El primer cambio de volumen ocurre cuando la célula es colocada dentro de un diluyente el cual contiene sustancias crioprotectoras como glicerol y posteriormente cuando la solución es congelada. Mas tarde ocurren cambios de volumen cuando la solución es descongelada. Estos cambios de volumen están asociados a cambios de la concentración de iones y electrolitos en las soluciones intra y extra celular. La forma en que ocurren estas modificaciones determinan la mayor o menor capacidad de la célula para soportar la injuria a la que se ve sometida. Los cambios de volumen son solo uno de los factores de estrés a los que la célula se ve sometida durante el proceso de criopreservación. Los diferentes factores de estrés están representados por los cambios de temperatura, el estrés tóxico producido por la exposición a crioprotectores,

la formación y disolución de hielo así como los cambios de osmolalidad en el ambiente extracelular (Leivo y Bradley, 1999).

Shock de frío

Es bien conocido que el enfriamiento rápido del semen entre 30°C y 0°C induce un estrés letal en algunas células, el cual es proporcional a la tasa de enfriamiento. Es así que el enfriamiento en este rango de temperaturas debe ser realizado cuidadosamente (Watson, 1995; Watson, 1981). Este fenómeno es conocido como shock de frío y puede apreciarse durante el enfriamiento de espermatozoides de cualquier especie. En el porcino este fenómeno se manifiesta inmediatamente después de la eyaculación haciéndose las células cada vez menos sensibles al mismo en las horas siguientes (Pursel y col, 1978).

Sin embargo, un lento enfriamiento induce estrés sobre la membrana del espermatozoide. Este hecho se relacionaría con un cambio de fase lipídica y alteraría el estado funcional de la membrana. Este fenómeno se relacionaría en parte con el efecto crioprotector observado al agregar trealosa al diluyente utilizado para congelación, ya que la trealosa posee la propiedad de interaccionar con los lípidos de membrana (Crowe y col, 1989) aumentando su estabilidad y limitando la fase de transición (Chen y col, 2000), ejerciendo así un efecto estabilizador de la membrana, lo cual explicaría su acción crioprotectora (Bakas y Disalvo, 1991). El shock de frío es visto como el estado extremo de un stress continuo influenciado por la velocidad con que este fenómeno se inicia. (24°).

El hecho de que el shock de frío es causado por un cambio de fase de los lípidos de la membrana fue propuesto por Dobrins en 1993 (Dobrins y col, 1993). Así mismo Holt obtuvo evidencias de que el cambio de fase podría ser el responsable de las manifestaciones de crioinjuria observadas durante el calentamiento celular luego de la descongelación. Estas evidencias fueron obtenidas a partir del estudio de la integridad de membrana de espermatozoides de carnero durante los procesos de enfriamiento (entre 5° y -20°C) y posterior calentamiento hasta 30 °C. En este experimento se observó que los mayores daños de membrana ocurrían durante el proceso de calentamiento luego de la descongelación (Holt y North, 1991).

El estrés de membrana puede continuar por debajo de 0°C sin que el cambio de fase sea completo a 0°C, sin embargo es bien conocido que los cambios de fase ocurren, en su mayoría, entre los 5°C y 15°C (Dobrins y col, 1993). Se ha demostrado la importancia de la composición lipídica del medio ambiente donde se encuentra la membrana plasmática durante el enfriamiento, esto relaciona al componente lipídico en el mecanismo de injuria (Pettit y Bhur, 1998; Watson, 1981). El agregado de preparaciones lipídicas purificadas a los espermatozoides reduce significativamente el shock de frío y el daño producido por la congelación-descongelación (Butler y Roberts, 1975; Parks y col, 1981; Graham y Foote,

1987). Usualmente se incluye yema de huevo en la preparación de los diluyentes debido a que los fosfolípidos (Quinn y col, 1980) y las lipoproteínas de baja densidad (Foulkes, 1977) poseen un efecto protector contra el shock de frío. El SDS es un detergente aniónico soluble en agua que se utiliza para solubilizar proteínas. Se ha observado que este detergente posee un efecto benéfico sobre la motilidad e integridad acrosómica relacionado con su acción sobre la yema de huevo. (Pursel y col, 1978). Sin embargo no deben pasarse por alto los otros componentes de membrana que pueden alterarse por este stress. Las proteínas integrales de membrana se encuentran asociadas a la bicapa lipídica y es esperable que alteren su función, sobre todo aquellas que cumplen funciones de transporte por ejemplo las que conforman los canales de calcio. De hecho es bien conocido que la permeabilidad aumenta con el enfriamiento, por lo tanto la regulación del calcio se ve afectada (Robertson y Watson, 1986; Robertson y col, 1988). Estos hechos tienen serias consecuencias sobre la funcionalidad celular (Bailey y Bhur, 1994) y muchas veces los cambios ocurridos pueden ser incompatibles con la viabilidad espermática. La absorción de calcio durante el enfriamiento posibilita que ocurran cambios relacionados con el proceso de capacitación como la fusión entre membrana plasmática y la capa externa de la membrana acrosomal. Existe gran similitud entre los cambios ocurridos durante el enfriamiento y la reacción acrosómica, es así que la primera comienza como una versión desorganizada de la segunda. Así mismo, los elementos del citoesqueleto son sensibles a la temperatura. Se ha postulado que la despolimerización de los filamentos de actina del citoesqueleto es un prerrequisito para la aproximación de la membrana plasmática a la membrana acrosomal externa en el camino hacia la exocitosis acrosomal (Spungin y col, 1995).

Crioprotectores y estrés celular

Los crioprotectores permiten mantener una mayor proporción de agua líquida a bajas temperaturas y en consecuencia una menor concentración de electrolitos posibilitando la supervivencia celular durante el proceso de criopreservación. Sin embargo, estos compuestos, incorporados a los diluyentes producen un estrés transitorio pero importante sobre la membrana plasmática de los espermatozoides, la magnitud de este hecho está íntimamente relacionada con la capacidad penetrante de los crioprotectores (Gao y col, 1993). El crioprotector de elección es el glicerol, el cual produce estrés osmótico. Se ha observado que la hiperosmolaridad producida por este compuesto posee un efecto estimulador de la reacción acrosómica (Aitken y col, 1983). Gao (Gao y col, 1993) ha demostrado que este estrés puede reducirse mediante la incorporación en etapas de glicerol en el proceso de criopreservación. Este procedimiento permite aumentar considerablemente la proporción de espermatozoides sobrevivientes al descongelado. Además del glicerol existen otros compuestos que poseen propiedades crioprotectoras como por ejemplo el etilenglicol (Gilmore y col, 1997). Los

espermatozoides son también sensibles a los efectos tóxicos de los crioprotectores, es así que los compuestos utilizados habitualmente para criopreservar otras células (ej. Dimetilsulfóxido (DMSO) resultan menos satisfactorios para la criopreservación espermática (Katkov y col, 1998). Se ha observado que el dimetilsulfóxido es más tóxico para los espermatozoides humanos que el glicerol., recuperándose un menor porcentaje de espermatozoides motiles al descongelado cuando se utiliza DMSO como crioprotector (Chong, 1984).

Estrés osmótico

Mazur estableció que cada tipo celular posee una velocidad óptima de congelación que garantiza su supervivencia luego de la criopreservación. Si la velocidad de congelación es demasiado rápida o demasiado lenta el estrés producido por el proceso de criopreservación aumenta (Foulkes, 1977). El estrés inducido por la formación de cristales de hielo está asociado a los cambios en la presión osmótica de la fracción no congelada (Watson y Duncan, 1988). Cuando una solución es enfriada por debajo del punto de congelación los cristales de hielo se nuclean y el agua pura cristaliza formando hielo. Los solutos permanecen disueltos en la fracción de agua líquida y por lo tanto la presión osmótica de la solución aumenta. La proporción de agua cristalizada como hielo y por lo tanto la presión osmótica de la solución restante depende de: la temperatura, la velocidad de descenso de la temperatura y el volumen de la fracción no congelada.

En general se reconoce que la duración de la exposición a estos eventos debería minimizarse para lograr una óptima sobrevida, implicando entonces que el enfriamiento celular debería ser rápido. Sin embargo la tasa de enfriamiento debe ser suficientemente lenta como para permitir la salida de agua intracelular gracias a la presión osmótica extracelular, y prevenir la formación de cristales de hielo intracelular, lo cual es letal para la célula. Las células espermáticas son congeladas a tasas bastante rápidas, en el rango de 15-60 °C/min, lo cual ha sido empíricamente calculado como la velocidad de congelación que permite mayor probabilidad de obtener una mejor tasa de sobrevida celular. Conociendo la permeabilidad hídrica celular y su activación energética podría predecirse la máxima tasa de enfriamiento compatible con el equilibrio osmótico y entonces determinar protocolos óptimos de criopreservación. Se ha demostrado que estas consideraciones son importantes para otros tipos celulares (Mazur, 1984a). La célula espermática de muchas especies posee una mayor permeabilidad al agua que otros tipos celulares (Noiles y col, 1993; Noiles y col, 1997; Gilmore y col, 1997).

Es importante considerar que la población espermática, tanto en diferentes especies como en un individuo en particular es muy heterogénea. Un eyaculado posee una diversa población de células con diferentes estados de maduración. Las diferencias entre poblaciones espermáticas entre especies y en un eyaculado simple se relacionan con la composición y

fluidez de la membrana celular, características que influyen su permeabilidad al agua y a solutos así como su susceptibilidad a la injuria por frío (Hammerstedt y Parks, 1987).

Holt and North han demostrado que los signos de estrés manifestado por los espermatozoides luego de la descongelación no se relacionan solo con el estrés osmótico sufrido en el descongelado sino también con el estrés sufrido durante el congelado.

El porcentaje de células que sobrevive a un proceso de congelación está determinado por la sensibilidad al estrés osmótico durante la adición y remoción de crioprotectores, y durante el enfriamiento y el recalentamiento. Si bien puede haber diferencias entre especies en la sensibilidad espermática a la criopreservación, el eyaculado es heterogéneo con una resistencia variable al estrés osmótico entre las células. El hecho de que los individuos puedan ser clasificados como “buenos congeladores” o “malos congeladores” implica que ciertas características de estructura de membrana, las cuales pueden estar genéticamente determinadas, predisponen a la supervivencia bajo el estrés de criopreservación (Leivo y Bradley, 1999).

A pesar de que optimicemos el proceso de criopreservación y minimicemos el riesgo de muerte celular, una parte de la población celular no es capaz de sobrevivir. Por lo tanto es necesario concentrarse en la funcionalidad de la población superviviente (Kathov y col, 1998).

Alteraciones observadas en los espermatozoides sobrevivientes a los procesos de criopreservación

Se ha comprobado que la motilidad espermática disminuye luego de la criopreservación.

En tanto que una pequeña parte de la población celular exhibe un movimiento progresivo vigoroso, la mayoría de las células muestran un variable grado de alteración de la motilidad en comparación con la motilidad del semen fresco. Este hecho puede estar íntimamente relacionado con la pobre capacidad fecundante del semen congelado. En un estudio de FIV con semen criopreservado realizado en humanos se encontró que tanto motilidad progresiva como vigor eran factores relacionados estrechamente con la fertilidad. (Kelly y col, 1997).

Los cambios de temperatura inducen a que los espermatozoides se comporten como si se capacitaran (Watson, 1995). Los espermatozoides enfriados muestran un aumento del calcio libre intracelular así como coloración con clortetraciclina, cambios típicos de la capacitación, sin embargo los patrones de fosforilación de tirosina son diferentes en espermatozoides enfriados y recalentados (Watson, 1995). Estos hechos marcan que si bien los cambios inducidos por la criopreservación en la célula espermática son similares a la capacitación los procesos difieren en algunos aspectos.

Se ha demostrado que los procesos de criopreservación inducen a la formación de especies reactivas de oxígeno las cuales poseen efectos tóxicos sobre las células y comprometen su

funcionalidad. (Alvarez y Storey, 1992; Bell y col, 1993). Diferentes antioxidantes han sido usados como parte de variados diluyentes en distintas especies y se ha verificado el efecto benéfico de los mismos (Askari y col, 1994). Sin embargo no debe olvidarse que el daño oxidativo es solo un de los diferentes factores de estrés al que es sometido el espermatozoide durante el proceso de congelación (Alvarez y Storey, 1992).

Recientemente se ha estudiado la capacidad de la población celular sobreviviente para interactuar con el epitelio del oviducto (Ellinton y col, 1999). Se ha demostrado que en la interacción de receptores celulares se combinan mecanismos intracelulares de transmisión de señales. Un tipo de interacción similar ocurre entre óvulo y espermatozoide (Ellinton y col, 1998). Estudios del efecto de la congelación sobre la membrana celular sugieren que la agrupación de las proteínas durante la fase de separación lipídica inducida por el enfriamiento no es enteramente reversible, esto podría tener implicancias sobre la estructura de los receptores y por lo tanto sobre la interacción de gametas. Si bien estudios de fertilización in vitro han demostrado que los espermatozoides criopreservados son capaces de fertilizar (Ellinton y col, 1999) solo algunos acceden al proceso pero muchos otros podrían estar estructuralmente afectados y ser incapaces de fertilizar.

Si bien no ha sido estudiada extensamente la relación entre semen criopreservado y sobrevida embrionaria, se sugirió la asociación entre espermatozoides congelados y aumento en la incidencia de mortalidad embrionaria temprana. (Maxwell y col, 1993). La ocurrencia de daños a nivel del DNA luego del proceso de criopreservación, podrían relacionarse con daños funcionales nucleares (Ellinton y col, 1998).

Conclusiones

Para que sea posible la interacción óvulo-espermatozoide y el comienzo de una nueva vida, el espermatozoide debe ser capaz de expresar su capacidad funcional a través de la ocurrencia de variados procesos con una adecuada secuencia temporal. Es así que un número suficiente de espermatozoides fértiles debe arribar a la ampolla para encontrarse con los oocitos y que ocurra así la secuencia de eventos necesarios para la fertilización.

Durante el proceso de criopreservación los espermatozoides se ven sometidos a variados y diversos tipos de estrés, lo cual puede inducir, en la célula espermática, daños letales o sub-letales los cuales comprometen su funcionalidad.

La identificación de la población espermática intacta así como el descarte de la población viva pero con daños sub-letales, permitiría optimizar el uso de del semen criopreservado y evitar la ocurrencia de potenciales errores genéticos con aumento de pérdidas embrionarias. El estudio funcional de las células y de los diferentes tipos de reacción celular en relación al estrés medioambiental y a las diferencias individuales (celulares interespecie e interindividuo) son dos puntos claves en el entendimiento y posibilidad de manejo del tipo y grado de daño celular.

Durante los últimos 50 años los avances obtenidos en la criopreservación de semen han tenido un profundo impacto sobre la biotecnología reproductiva humana y animal. Sin embargo muchos tópicos sobre la criopreservación de semen permanecen oscuros. Futuras investigaciones sobre este tema permitirán obtener nuevos avances en el área.

Bibliografía

- Aitken, R.J ; Wang, Y.F; Liu, J; Best, F; Richardson, D.W. (1983). "The influence of medium composition osmolarity and albumin on acrosome reaction and fertilizing capacity of human spermatozoa development of an improved zona-free hamster egg penetration test". *Int. J. Androl*, 6, pp.180-193.
- Alvarez, J.G; Storey, B.T. (1992). "Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation". *Int. J. Androl*, 13, pp. 232-241.
- Amann, R.P; Hammersted, R.H. (1993). "In vitro evaluation of sperm quality an opinion". *Int. J. Androl*, 14, pp. 397-406.
- Askari, H.A; Check, J.H; Peymer, N; Bollendorf, A. (1994). "Effect of antioxidant tocopherol and ascorbic acids in maintenance of sperm activity during freeze-thaw process". *Arch. Androl*, 33, pp. 11-15.
- Bailey, J.L; Bhur, M.M. (1994). "Cryopreservation alters the Ca^{++} flux of bovine spermatozoa Can". *J. Anim. Sci*, 74, pp. 45-51.
- Bakás, L.S; Disalvo, E.A. (1991). "Effect of Ca^{2+} on the cryoprotective action of trehalose". *Cryobiology*, 28, pp. 347-353.
- Bell, M; Wang, R; Hellestron, W.J; Sikka, SK. (1993). "Effect of cryoprotective additives and cryopreservation protocol on sperm membrane lipid peroxidation and recovery of motile human sperm". *J. Androl*, 14, pp. 472-478.
- Blach, E.L; Amann, R.P; Bowen, R.A; Frantz, D. (1989). "Changes in quality of stallion spermatozoa during cryopreservation: plasma membranes integrity and motion characteristics". *Theriogenology*, 3, pp. 283-298.
- Butler, W.J; Roberts, T.K. (1975). "Effects of some phosphatidyl compounds on boar spermatozoa following cold shock or slow cooling". *J. Reprod. Fertil*, 43, pp.183-187.
- Chen, Y; Foote, R.H; Tobback, C; Zhang, L; Hough, S. (1993). "Survival of bull spermatozoa seeded and frozen at different rates in egg yolk-tris and whole milk extenders". *J Dairy Sci*, 76, pp.1028-1034.
- Chen, T; Fowler, A; Torner, M. (2000). "Supplemented phase diagram of the trehalose –water binary mixture". *Cryobiology*, 40, pp. 277-282.
- Chong, A.P. (1985). "Artificial insemination and sperm banking: clinical and laboratory considerations". *Semin Reprod Endocrinol*, 3, pp.193-200.
- Cohen, J; Felten, P; Zeilmaker, G. H. (1981). "In vitro fertilizing capacity of fresh and cryopreserved human spermatozoa: a comparative study of freezing and thawing procedures". *Fertil Steril*, 36, pp. 356-362.
- Crister, J.K; Huse-Benda, A.R; Aaker, D.D; Arneson, B.W; Ball, G.D. (1987). "Cryopreservation of human spermatozoa. Post-thaw chronology of motility and of zona-free hamster ova penetration". *Fertil Steril*, 47, pp. 980-984.

- Crowe, J; Carpenter, J; Crowe, L; Anchordoguy, T.J. (1989). "Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules". Symposium on cryosensitizing and cryoprotective agents. 26 th Annual meeting of the society for cryobiology, (pp. 219-224). Charleston, South Carolina.
- Dhami, A.J; Sahni, K.N; Mohan, G. (1992). "Effect of various cooling rates (from 30 °C to 5 °C) and thawing temperatures on the deep freezing of *Bos Taurus* and *Bos bubalis* semen²". *Theriogenology* ,38, pp. 565-574.
- Dobrins, E.Z; Crowe, L.M; Berger, T; Anchordoguy, T; Oversteet, J.W; Crowe, J.H. (1993). "Cold shock damage is due to lipid phase transition in cell membranes: a demonstration using sperm as a model". *J. Exp. Zool* , 265, pp. 432-437.
- Dumbar, B.S; O`Rand, M.G. (1983). "A comparative overview of mammalian fertilization" (pp. 139-175). USA, New York: New York Press.
- Ellinton, J.E; Evenson, D.P; Fleming, J.E; Brisbois, R.S; Hiss, G.A; Broder, S.J; Wright, R.W. (1998). "Coculture of human sperm with bovine oviduct epithelial cells decreases sperm chromatin structural changes seen during culture in media alone". *Fertil. Steril*, 69, pp. 643-649.
- Ellinton, J.E; Samper, J.C; Jones, A.E; Oliver, S.A; Brunett, K.M; Wright, R.W. (1999). "In vitro interaction of cryopreserved stallion spermatozoa and oviduct (uterine tube) epithelial cells or their secretory products Anim". *Reprod.*, 56, pp. 51-65.
- Foulkes, J.A. (1977). "The separation of lipoproteins from eggs yolk and their effect on motility and integrity of bovine spermatozoa". *J. Reprod. Fertil*, 49, pp.277-284.
- Gao, G.Y; Ashworth, E; Watson, P.F; Kleinhans, F.W; Mazur, P; Crister, J.K. (1993). "Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride and sucrose on spermolysis". *Biol Reprod.*, 49, pp. 112-123.
- Gilmore, J.A; Liu, J; Gao, D.Y; Crister, J.K. (1997). "Determination of optimal cryoprotectants and procedures for their addition and removal from human sperm spermatozoa". *Hum. Reprod*, 12, pp. 112-118.
- Glaub, J.C; Mills, R.N; Katz, D.F. (1976). "Improved motility recovery of human spermatozoa after freeze preservation via a new approach". *Fertil Steril.*, 27, pp. 1283-1291.
- Graham, J.K; Foote, R.H. (1987). "Effect of several lipids, fatty acyl chain length and degree of unsaturation on the motility of bull". *Cryobiol.*,24, pp. 42-52.
- Hammerstedt, R.H; Parks, J.E. (1987). "Changes in sperm surfaces associated with epididymal transit". *J. Reprod Fert.*, 34, pp. 133-149.
- Holt, W.V; North, R.D. (1991). "Cryopreservation, actin localization and thermotropic phase transitions in ram spermatozoa". *J. Reprod. Fert.*,91, pp. 451-461.
- Hunter, R.H.F. (1984). "Pre-ovulatory arrest and periovulatory redistribution of competent spermatozoa in the asthmus of the pig oviduct". *J. Reprod. Fertil*, 72, pp. 203-211.
- Hunter, R.H.F. (1996). "Ovarian control of very low sperm / egg ratios at the commencement of fertilization to avoid polyspermy". *Mol. Reprod. Dev.*,44, pp. 417-422.

- Katkov, I.I; Katkova, N; Crister, J.K; Mazur, P. (1998). "Mouse spermatozoa in high concentration of glycerol: chemical toxicity vs. osmotic shock at normal and reduced oxygen concentrations". *Cryobiology*, 37, pp. 325-338.
- Kelly, M.P; Corson, S.D; Social, B; Batzer, F.R; Gutman, J.N. (1997). "Discontinuous Percoll gradient preparation for donor insemination: determinants for success". *Human Reprod.*, 12, pp. 2682-2686.
- Leivo, S.P; Bradley, L. (1999). "Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa in Gagnon, C. (Eds) The male gamete". *McGill University*, 46, pp. 502-517.
- Maxwell, W.M.C. (1986). "Artificial insemination of ewes with frozen thawed semen at a synchronised oestrus: II. Effect of dose of spermatozoa and site of intrauterine insemination on fertility". *Anim. Reprod. Sci.*, 10, pp. 309-316.
- Maxwell Evans, W.M.C; Evans, G; Rhodes S.L; Hillard, M.A; Bindon, B.M. (1993). "Fertility of superovulated ewes after intrauterine or oviductal insemination with low number of fresh or frozen-thawed spermatozoa". *Repro. Fertil. Dev.*, 5, pp. 57-63.
- Mazur, P. (1970). "Cryobiology: the freezing of biological system". *Science*, 68, pp. 939-949.
- Mazur, P; Leivo, S.P; Chu, E.H.Y. (1972). "A two-factor hypothesis of freezing injury". *Experimental cell research*, 71, pp. 345-355.
- Mazur, P. (1984a). "Freezing of living cells. Mechanism and implications". *Am. J. Physiol.*, 147, pp. 125-142.
- Mazur, P. (1984b). "Freezing of living cells: mechanisms and implications". *Am. J. Physiol.*, 247, pp. 125-142.
- Noiles, E.E; Mazur, P; Watson, P.F; Kleinhans, F.W; Crister, J.K. (1993). "Determination of water permeability coefficient for human spermatozoa and its activation energy". *Biol. Reprod.*, 48, pp. 99-109.
- Noiles, E.E; Thompson, K.A; Storey, B.T. (1997). "Water permeability, L_p , of mouse sperm plasma sperm cytoskeleton". *Cryobiology*, 35, pp. 79-92.
- Parks, J.E; Meacham, T.N; Saacke, R.G. (1981). "Cholesterol and phospholipids of bovine spermatozoa. Effect of liposomes prepared from egg phosphatidylcholine and cholesterol on sperm cholesterol, phospholipids and viability at 4°C and 37°C". *Biol. Reprod.*, 24, pp. 399-404.
- Parks, J.E; Graham, J.K. (1992). "Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes". *Theriogenology*, 38, pp. 209-222.
- Pettit, M.J; Bhur, M.M. (1998). "Extender components and surfactants after boar sperm function and membrane behavior during cryopreservation". *J. Androl.*, 19, pp. 736-746.
- Pursel, V.G, Shulman, L.L; Jonshon, L.A. (1978). "Effect of Orvus ES paste on acrosomal morphology, motility and fertilizing capacity of frozen thawed boar sperm". *J. Anim. Sci.*, 47, pp. 198-202.
- Quinn, P.J; Chow, P.Y.W; White, I.G. (1980). "Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at plasma membrane site". *J. Reprod. Fertil.*, 60, pp. 403-407.

- Robertso, L; Watson, P.F. (1986). "Calcium transport in diluted or cooled ram semen". *J. Reprod. Fertil*, 77, pp. 117-185.
- Robertson, L; Watson, P.F; Plunier, J.M. (1988). "Prior incubation reduces calcium uptake and membrane disruption in boar spermatozoa subjected to cold shock". *Cryo-Lett.*, 9, pp. 286-293.
- Spungin, B; Maregalit, I; Britbart, H. (1995). "Sperm exocytosis reconstructed in a cell free system. Evidence for the involvement of phospholipase C and actin filaments in membrane fusion". *J. Cell Sci.*, 108, pp. 2525-2535
- Watson, P.F. (1981). "The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg-yolk lipoprotein". *J. Reprod. Fert.*, 62, pp. 483-492.
- Watson, P.F; Duncan, A.E. (1988). "Effect of salt concentration and unfrozen water fraction on the viability of slowly frozen ram spermatozoa". *Cryobiology*, 25, pp.131-142.
- Watson, P.F. (1995). "Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function". *Reprod. Fertil. Dev.*, 7, pp. 781-791.
- Watson, P.F. (2000). "The causes of reduced fertility with cryopreserved semen". *Animal Reproduction Science*, 60-61, pp. 481-492.

CAPITULO 16

Fertilidad y supervivencia del semen canino criopreservado

María Alejandra Stornelli

El aumento del valor y las posibilidades de comercialización de los cachorros de pura raza así como el aumento de la importancia de la cría canina tanto desde el punto de vista económico, recreativo o para la obtención de perros de trabajo ha impulsado el desarrollo e implementación de las biotecnologías reproductivas en esta especie.

La Inseminación Artificial (IA) ha beneficiado el mejoramiento genético en los perros de raza pura. El desarrollo de IA (la primera generación de biotecnologías reproductivas), junto con la criopreservación de semen ha hecho posible la distribución por el mundo de material genético a un bajo costo. Diversas metodologías de criopreservación de semen, se están aplicando cada vez con más frecuencia con el fin de establecer bancos de reserva genética para conservar las diferentes especies en el futuro (Luvoni, 2000). Las especies en vías de extinción son los principales impulsores y receptores de esta corriente (Fastard, 2000).

La primera comunicación de IA en caninos fue realizada en 1887 por Lazzaro Spallanzani quien utilizó semen fresco (Peña Martinez, 1997; Spallanzani, 1776; Stornelli y col, 2001b). Sin embargo fue muchos años más tarde cuando este tópico se convirtió en foco de interés para la investigación. En 1956, Harrop (Harrop, 1956) comunica que una de seis perras inseminadas con semen refrigerado después de seis días de almacenamiento resultó preñada. En 1954,

Rowson (Rawson, 1954) notifica la primera congelación de semen exitosa en caninos y más tarde en 1969, Seager (Seager, 1969) obtiene la primera preñez con semen congelado en perros. Desde la ocurrencia de estos eventos, el interés de los criadores caninos en la IA y la criopreservación de semen han aumentado en forma creciente. Es así que en el mundo, por aproximadamente 5 décadas, muchas camadas han nacido a partir de IA con semen fresco, refrigerado y congelado. Sin embargo las tasas de preñez obtenidas a partir de IA usando semen congelado son aún poco satisfactorias y esto ocurre en particular con las obtenidas bajo condiciones clínicas. En la clínica reproductiva diaria las variables asociadas al manejo del semen en la descongelación, a la técnica de IA implementada y a la detección del momento de mayor fertilidad están fuertemente influenciadas por el entrenamiento del operador actuante, a la infraestructura de la clínica en la que se realiza el procedimiento y al estado de salud y nutrición de los reproductores utilizados (Fontbonne y Badinand, 1993; Fosberg CL y Fosberg M, 1989; Fosberg CL y Fosberg M, 1993; Fosberg, 1995; Gill y col, 1970). Estos hechos se relacionan tanto con las particularidades de la fisiología reproductiva de la hembra como con la especial sensibilidad del semen canino a los procesos de criopreservación y la falta de desarrollo en este área. (Fosberg, 1995; Johnston y col, 2001). Es así que son necesarias investigaciones dirigidas a mejorar la habilidad para mantener la capacidad fecundante del semen congelado en caninos y obtener así tasas de preñez y tamaños de camada satisfactorios.

Para que sea posible la interacción óvulo-espermatozoide y el comienzo de una nueva vida, un número suficiente de espermatozoides fértiles debe arribar a la ampolla para encontrarse con los oocitos y que ocurra así la secuencia de eventos necesarios para la fertilización (Amann y Hammersted, 1993; Watson, 1981).

Evaluación de la calidad seminal y predicción de la capacidad fecundante

Existen una gran variedad de pruebas de laboratorio que han sido desarrolladas para evaluar la calidad del semen (integridad espermática y capacidad fecundante) usado para IA, y predecir así la capacidad fecundante del mismo. El uso de estas pruebas en forma combinada puede aumentar la exactitud en la estimación de la función espermática. Sin embargo, es imposible reemplazar las pruebas de campo, pues las pruebas *in vitro* nunca podrán predecir exactamente que ocurrirá cuando se encuentren óvulo y espermatozoide *in vivo* (Amann y Hammersted, 1993; Larson y Rodriguez-Martinez, 2000). Los métodos más precisos para evaluar la capacidad de fecundante del semen luego de ocurrido un proceso de criopreservación son las pruebas de campo, es decir la inseminación de un gran número de hembras (Amann, 1989). Este hecho fue posible en los animales de granja (Chupin y Schuh,

1993; Chupin y Thibier, 1995; Salamon y Maxwell, 1995). Sin embargo, en pequeños animales las pruebas de fertilidad a campo son difíciles de implementar ya que usualmente solo un pequeño número de hembras está disponible para el estudio, razón por la cual poseen baja sensibilidad.

Pruebas de contrastación seminal

Las pruebas in vitro de evaluación seminal pueden relacionarse con la morfología o viabilidad espermática (Saacke, 1982). Las pruebas que se relacionan con el estudio morfológico del espermatozoide se considera que reflejan la producción espermática y el almacenamiento extragonadal. Las pruebas que evalúan la viabilidad espermática proveen información no solo de la calidad espermática del semen producido sino también del efecto causado por el estrés de la recolección y la criopreservación (Saacke, 1983; Xia-Zou y Ming-Yang, 2000). Los procesos de congelación y descongelación someten a los espermatozoides a diferentes tipos de estrés provocando daños de membrana, alteración del metabolismo espermático y pérdida de la motilidad, factores que afectan la capacidad fecundante del semen (Mazur, 1970; Strom Holst y col, 2000a; Watson, 1976; Watson, 1979).

Evaluación de las membranas espermáticas

Se considera que el principal sitio de daño asociado a los cambios de temperatura son las membranas espermáticas (Watson, 1976; Watson, 1979). La reducción de la fertilidad asociada al semen congelado es atribuida en gran parte a la alteración de la estructura y función de las membranas durante los procesos de refrigeración, congelación y descongelación (Mazur, 1970; Watson, 1976; Mazur y col, 1972). Para poder interactuar con el ovocito, los espermatozoides deben estar vivos, motiles y poseer las membranas plasmática y acrosomal intactas y funcionales. Existen variadas metodologías que pueden utilizarse para estudiar la viabilidad espermática e integridad de membrana. Una de estas metodologías está representada por tinciones que permiten diferenciar espermatozoides vivos de espermatozoides muertos en base a la permeabilidad de membrana a los colorantes vitales. Las células cuya membrana plasmática es funcional y por lo tanto conservan la permeabilidad selectiva, no permiten el paso del colorante y se observan no teñidas. Por el contrario cuando la membrana plasmática está alterada y pierde la permeabilidad selectiva, permite el paso del colorante y la célula se observa teñida (Watson, 1990). Algunos ejemplos de coloraciones vitales son eosina-nigrosina, eosina azul de anilina, azul tripán (Johnston, 1991). Existen también tinciones que permiten evaluar simultáneamente viabilidad espermática e integridad acrosomal. La triple tinción utilizando azul

tripán, marrón bismark y rosa de bengala permite observar si la membrana plasmática de la célula conserva la permeabilidad selectiva no permitiendo el paso del azul tripán así como también la integridad del acrosoma el cual si está presente en la célula se teñirá con rosa de bengala pudiendo observarse si está íntegro o si está dañado (Peña Martinez, 1997; Stornelli y col, 2001b). También pueden emplearse sustancias fluorescentes permeables como marcadores de integridad de membrana, por ejemplo yoduro de propidio o bisbencimida (propidium iodide o bis-benzimide) combinado con Isotiocianato de fluoresceína usando microscopio de fluorescencia. Los espermatozoides que han perdido la permeabilidad selectiva de membrana dejan pasar al yoduro de propidio y se observan rojos (Garner y col, 1986). La aplicación del citómetro de flujo permite realizar una evaluación exacta y objetiva de la célula espermática mediante la aplicación de pruebas fluorescentes (Harrison y Miller, 1998). Sin embargo el costo de los equipos impide el uso de esta técnica en muchos laboratorios de investigación y centros comerciales. Una prueba sencilla, poco costosa y que posee buena correlación con la capacidad fecundante del semen es la prueba de endósmosis positiva (EP). En esta prueba los espermatozoides son expuestos a una solución hipotónica la cual produce el hinchamiento celular por entrada de agua a la célula, induciendo de esta manera el enrollamiento de la cola de los espermatozoides que poseen membrana plasmática intacta (Hideki y col, 1993; Rodriguez-Gil y col; 1994).

Los procesos de criopreservación afectan la integridad acrosómica. El acrosoma debe estar intacto en el momento de la inseminación debido a que la reacción acrosómica debe ocurrir en el sitio donde ocurra la fertilización. La morfología acrosómica puede ser observada mediante microscopio de contraste de fase, microscopio electrónico de transmisión, lectinas marcadas con sustancias fluorescentes y anticuerpos monoclonales (Kawakami y col, 1993; Stornelli y col, 2001a). Dentro de las lectinas marcadas con fluorescentes, el *Pisum sativum* (PSA) conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) es el más usado para detectar cambios acrosomales mediante el uso de pruebas fluorescentes (Kawakami y col, 1993). El PSA se une en forma selectiva a las proteínas acrosomales de los espermatozoides de los mamíferos permitiendo visualizar la integridad acrosómica a través de su conjugación con el FITC (Mendoza y col, 1992).

Motilidad

La motilidad espermática se evalúa antes y después de la criopreservación. Los espermatozoides necesitan ser motiles y capaces de sufrir hiperactivación para lograr alcanzar y penetrar las capas que rodean al ovocito cuando ambas células se encuentran en el oviducto. La estimación visual de la motilidad es el método más simple y menos costoso para evaluar la calidad seminal. Sin embargo debe tenerse en cuenta que es el parámetro más influenciado por el operador (Saacke, 1982). El sistema de análisis computarizado de semen (CASA,

Computer assisted semen analysis) combina una cámara termostáticamente controlada (cámara de Makler en la que se deposita una alícuota de semen y se mantiene la temperatura a 37°C durante el examen), un sistema óptico con iluminación de contraste de fases, un detector de imágenes, un conversor digital, un sistema de computación y un monitor de video. Este sistema permite medir el porcentaje de espermatozoides móviles, el porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva y la velocidad de movimiento. El uso del sistema CASA provee mediciones más objetivas y confiables de la motilidad espermática (Irvine, 1995; Vestergren y col, 2002) y permite no solo evaluar motilidad espermática sino también diferenciar sub-poblaciones en relación al tipo de motilidad espermática (e.g. espermatozoides que muestran movimientos lineales o de hiperactividad) (Holt y col, 1996). Sin embargo, el sistema CASA es costoso y necesita una exacta calibración (Stornelli y col, 2003a). Si bien, la motilidad es solo uno de los muchos atributos de un espermatozoide fértil, fue el primer atributo utilizado y sigue siendo el más frecuentemente usado como indicador de la función espermática.

Proceso de criopreservación espermática

El semen puede ser conservado mediante refrigeración o congelación. La refrigeración disminuye la tasa metabólica y prolonga la sobrevivencia espermática. Los diluyentes de semen utilizados para refrigeración protegen las membranas espermáticas de los daños causados por los cambios de temperatura, proveen energía, estabilizan el pH y la presión osmótica (Strom Holst y col, 2000a). La yema de huevo es un componente habitual de los diluyentes para semen debido a que sus fosfolípidos y proteínas de baja densidad protegen al espermatozoide del shock de frío (Foulkes, 1977; Quinn y col, 1980). En 1956, Harrop (Harrop, 1956) comunica la primera preñez en caninos con semen refrigerado a 4°C durante 4 días usando un diluyente a base de leche. Desde entonces varios diluyentes han sido probados para su uso con semen canino (Andersen, 1980; Concannon y Battista, 1989; Rota y col, 1995). Uno de los diluyentes más comúnmente usados es el Tris-citrato conteniendo 20% de yema de huevo (TYH) (Concannon y Battista, 1989; Stornelli y col, 2002), el cual permite el uso de semen refrigerado con buena capacidad fecundante durante 24-48 horas pos-refrigeración, obteniéndose porcentajes de preñez aceptables 62,5% (Fosberg, 1989; Aisen y col, 2002; Rota y col, 1995). Este diluyente se ha comparado *in vitro* con diluyentes preparados en base a leche y yema de huevo; y crema de leche y yema de huevo, observándose resultados similares en cuanto a la conservación de motilidad espermática e integridad de membrana (Rota y col, 1995). El MRA® (glucosa, EDTA, citrato de sodio, acetato de potasio, aminoglucósidos, excipiente tampón), es un diluyente que posibilita buena conservación del semen porcino tanto en relación a la viabilidad espermática como a la preservación de la capacidad fecundante (Watson, 1976; Paquignon y col, 1979). Este diluyente con el agregado de 20% de yema de huevo permitió obtener en caninos, parámetros seminales (porcentaje de espermatozoides vivos, porcentaje

de espermatozoides con motilidad progresiva, porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto) significativamente mayores que el TYH cuando el semen fue refrigerado durante 24, 48 o 72 hs tanto a 4° C como 15° C (Stornelli y col, 2002). Se ha observado que la longevidad del semen canino es significativamente mayor a 4° C que a 22° C (Bouchard y col, 1990). Sin embargo no se observaron diferencias significativas cuando se conservó a 4° C o 15° C (Stornelli y col, 2002).

Tanto el tipo de diluyente usado como la temperatura de almacenado son factores que poseen gran influencia sobre la capacidad fecundante del semen luego de la refrigeración (Watson, 2000). El semen refrigerado, no requiere el uso de equipos sofisticados para su preparación y puede utilizarse mediante la aplicación de IA vaginal (Fastard, 2000; Fosberg, 1995). Para la refrigeración se colecta la fracción espermática del semen canino 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. El semen así preparado puede refrigerarse a 4 °C o 15°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 (Fosberg, 1995).

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 (Stornelli y col, 2001a).

En nuestro país, hasta hace poco tiempo, se practicaba IA exclusivamente con semen fresco, posteriormente comenzó a utilizarse semen refrigerado. En muchos países de Europa así como en Estados Unidos la IA con semen refrigerado es una práctica rutinaria, sin embargo no ocurre lo mismo en Sudamérica.

Este método de criopreservación de semen puede ser implementado con bajo costo, fácil manejo y moderada infraestructura, factores que pueden determinar, en el futuro, su uso rutinario en Sudamérica, mejorando así las posibilidades del uso del semen de reproductores valiosos.

Los procesos de congelación-descongelación resultan en reducción de la fertilidad del semen criopreservado si lo comparamos con el semen fresco. Este hecho es el resultado tanto de la pérdida de viabilidad espermática (población de espermatozoides muertos) como de las alteraciones funcionales instauradas en la población sobreviviente (Watson, 1979).

Los espermatozoides criopreservados exhiben modificaciones de membrana similares a las ocurridas en espermatozoides capacitados, dichos eventos reducen la longevidad espermática (Rota y col, 1999). Estos cambios similares a la capacitación espermática están relacionados

con eventos que desestabilizan las membranas. Un aumento de la tasa de concepción puede lograrse mejorando los métodos de criopreservación tratando de prevenir o minimizar la ocurrencia de los eventos que desestabilizan las membranas y aumentando así la cantidad de espermatozoides con capacidad fecundantes en la población de espermatozoides sobrevivientes luego del proceso de criopreservación (Watson, 1976; Watson, 1979). Existen variados tipos de daños asociados tanto al enfriamiento propiamente dicho como a los componentes de un diluyente. Estos daños están relacionados con los cambios de temperatura (shock de frío), la toxicidad de los crioprotectores y la formación y disolución de hielo en el medio ambiente extracelular (Strom Holst y col, 2000a; Rota y col, 1997; Gao y col, 1995; Strom Holst y col, 1998; Strom Holst y col, 2000b). Cada paso del protocolo de criopreservación podría afectar la estructura de la membrana así como el metabolismo y la función celular. Sin embargo los pasos están interrelacionados entre sí y un cambio en uno de ellos puede modificar el efecto de otras variables (Hammerstedt y col, 1990).

Las primeras preñeces obtenidas en caninos a partir de IA con semen congelado fueron logradas utilizando lactosa y un diluyente con base Tris (Seager, 1969; Andersen, 1972). Desde entonces, variados diluyentes han sido evaluados para su uso en caninos, sin embargo los diluyentes en Tris Base son aún los usados más frecuentemente (Peña Martinez, 1997; Andersen, 1972; Battista y col, 1998; Davies, 1982; England, 1992; England, 1993; Fastard, 1984; Rigau y col, 2001; Rota y col, 1997). En la actualidad, el glicerol es el crioprotector usado con más frecuencia en la preparación de diluyentes de semen, habiendo sido utilizado también el dimetilsulfoxido (DMSO) (England, 1993; Fastard, 1996). Existen otros compuestos como el duodecil sulfato de sodio (SDS), glicina betaina, prolina y metilxantinas que han sido incluidos en los diluyentes utilizados para congelación de semen canino (Rota y col, 1997; Koutsarova y col, 1997; Peña Martinez y col, 1998; Peña y Forsberg, 2000).

La yema de huevo es el componente más efectivo para proteger al espermatozoide del shock de frío y es generalmente incluido en los diluyentes utilizados para criopreservación. Este componente previene la aparición de colas dobladas y protege la motilidad (Holt y North, 1991; Holt y col, 1998). El compuesto activo en la yema de huevo es la fracción de lipoproteína de baja densidad, una molécula de alto peso molecular que solo puede actuar en la superficie celular (Strom Holst y col, 1998). Se ha comprobado que la acción de ciertos detergentes sobre las lipoproteínas de la yema de huevo mejora el efecto crioprotector de los diluyentes de semen en algunas especies (Peña y Forsberg, 2000; Arriola y Foote, 1987; Graham y col, 1971; Pendfold y Moore, 1993). Compuestos detergentes que contienen dodecil sulfato de sodio (SDS) solos o como un componente del Equex STM[®] paste (detergente comercial) han sido incluidos en diluyentes de semen usados para la congelación de semen canino (Fosberg, 1995; Quinn y col, 1980; Fosberg y col, 1999; Nothling y Volkman, 1997). Se observó que la adición de Equex STM paste a un diluyente con base Tris mejora la supervivencia espermática al descongelado (Peña Martinez y col, 1998; Peña y Forsberg, 2000; Stornelli y col, 2001a; Stornelli, 2006) así como la capacidad espermática para unirse a la zona pelúcida de ovocitos

homólogos (Stornelli y col, 2001b; Stornelli y col, 2001c; Stornelli y col, 2002). Peña (Peña y Forsberg, 2000), observó un efecto benéfico en todos los indicadores de viabilidad espermática al utilizar dos pasos de dilución en el protocolo de congelación cuando incorpora Equex STM paste al diluyente. Sin embargo no se ha evaluado el efecto de diferentes concentraciones de Equex STM paste sobre la viabilidad espermática al descongelado. Notthing (Nothling y col, 1995) obtuvo altos porcentajes de preñez mediante IA intravaginal con semen criopreservado utilizando un diluyente con el agregado de Equex STM paste. Así mismo Rota (Rota, 1998) obtuvo buenos resultados utilizando inseminación artificial intravaginal e intrauterina con semen congelado utilizando Equex STM paste. Sin embargo no existen estudios de fertilidad en relación con las concentraciones de Equex STM paste utilizadas en la formulación de los diluyentes.

Diferentes tipos de azúcares han sido incluidos en los diluyentes usados para congelación de semen canino (Norton y Bruce, 1989; Watson, 1979). Los azúcares utilizados poseen variadas funciones tales como proveer un sustrato energético para las células espermáticas durante la incubación, mantener la presión osmótica del diluyente y actuar como crioprotectores (Strom Holst, 1999). Se ha estudiado la influencia de los azúcares (monosacáridos, disacáridos, trisacáridos), sobre la motilidad, viabilidad y porcentaje de acrosomas intactos durante la dilución, equilibración y congelación de espermatozoides caninos (Strom Holst, 1999). La suplementación del diluyente con azúcares influencia la calidad espermática pos-equilibración y pos-descongelación. El tipo y localización del impacto protector del azúcar sobre la célula espermática varía de acuerdo al tipo de azúcar utilizado (Strom Holst, 1999; Bakas y Disalvo, 1991; Crowe y col, 1989; Stornelli y col, 2003b; Watson y Duncan, 1988).

La trealosa es usada como una molécula protectora en la estabilización celular durante la congelación. Durante la congelación ocurren fenómenos de deshidratación celular. Este azúcar es acumulado en altas concentraciones (superiores al 20%) en muchos organismos capaces de sobrevivir a la deshidratación completa. Por ejemplo las levaduras utilizadas en panadería, las cuales han sido han sido estudiadas exhaustivamente, no sobreviven a la desecación durante la fase de crecimiento logarítmico (en la cual no poseen cantidades significativas de trealosa), pero durante la fase estacionaria ellas acumulan este azúcar y pueden desecarse satisfactoriamente (Crowe y col, 2001; Argüelles, 2000).

Se ha comunicado el efecto benéfico en la viabilidad espermática al descongelado en espermatozoides de carnero y equino cuando el diluyente es suplementado con trealosa (Aisen y col, 2000; Aisen y col, 2002; Juliani y col, 2003). Este disacárido posee un efecto protector relacionado con el efecto osmótico que produce y su interacción específica con los fosfolípidos de membrana (Crowe y col, 1989; Stornelli y col, 2003b).

Por debajo de aproximadamente -5°C , las células y el medio que las rodea permanece no congelado gracias al superenfriamiento y al descenso del punto de congelación producido por los solutos protectores presentes frecuentemente en el medio externo. Es así que el contenido de la célula permanece no congelado y superenfriado, presumiblemente pues la membrana

plasmática bloquea el desarrollo de cristales de hielo dentro del citoplasma. El agua superenfriada de la célula, tiene por definición un potencial químico mayor que el agua parcialmente congelada existente en el exterior de la célula. El medio externo de la célula como consecuencia de la congelación parcial y de la formación de cristales de hielo, posee una concentración de solutos mayor en la fracción líquida externa que antes de la formación de los cristales de hielo (Watson y Duncan, 1988). Esto determina que el medio externo que rodea a la célula posea una mayor presión osmótica que el medio celular interno. En respuesta a los fenómenos ocurridos y a las diferencias fisicoquímicas entre el medio interno y externo el agua sale de la célula y se congela externamente. Si el enfriamiento es suficientemente lento, la célula es capaz de perder agua y concentrar suficientemente los solutos para eliminar el superenfriado y mantener el potencial químico del agua intracelular en equilibrio con el agua extracelular. El resultado es que la célula se deshidrata y no se congela en su interior (Mazur, 1984).

Los azúcares no permeables (trealosa, lactosa, sacarosa, rafinosa) brindan un medio hipertónico causando deshidratación celular antes de la congelación (Crowe y col, 1989; Crowe y col, 2001; Aisen y col, 1990). Este efecto osmótico disminuye el agua intracelular congelable y en relación a esto la cuantía de daño celular por la cristalización del hielo (Aisen y col, 2002; Chen y col, 2000).

El mayor grado de estrés sufrido por los fosfolípidos de la bicapa lipídica de la membrana resulta en una transición de fase termotrópica, fusión y aumento de la permeabilidad de membrana. Debido a que el agua, ligada al hidrógeno de los grupos polares de las cabezas, es removida por la deshidratación aumenta la temperatura de transición (T_m) de gel a líquido cristalino. Sin embargo la solubilidad fosfolipídica de la fase gel está siempre disminuida relativamente en comparación con lo que se observa en la fase líquida cristalina y podrían existir diferencias de sensibilidad en la T_m en el estado de hidratación lo cual puede resultar en separación fosfolipídica (Crowe y col, 1989). La trealosa posee una acción protectora relacionada con su interacción específica con los fosfolípidos de membrana (Bakas y Disalvo, 1991; Crowe y col, 1989; Crowe y col, 2001; Yildiz y col, 2000) y puede ser capaz de prevenir la separación de fase y la fusión entre las bicapas durante la congelación (Johnston y col, 2001). Este azúcar muestra una interacción directa con los fosfolípidos de las cabezas de los grupos polares durante la desecación y congelación, reduciendo las fuerzas de Van der Waals entre las cadenas hidrocarbonadas que se relacionaría con la disminución de T_m (Bakas y Disalvo, 1991; Yildiz y col, 2000). El agregado de trealosa al diluyente utilizado para la congelación de semen canino podría mejorar la viabilidad espermática al descongelado sin embargo los estudios realizados no ha observado efecto benéfico de este azúcar (Yanagimachi, 1994; Stornelli, 2004; Stornelli, 2007).

El espermatozoide es una célula altamente especializada con una membrana plasmática que no solo ayuda a mantener la integridad celular sino también participa en los eventos de fusión de membrana asociados con la fertilización (Morris, 1981). La membrana plasmática es

considerada como el sitio donde se inicia la injuria inducida por la congelación (Mahadevan y Trouson, 1984). En humanos, la integridad de la membrana plasmática y acrosómica fue estudiada mediante microscopio electrónico de transmisión (MET) y se observó una correlación positiva entre los daños observados y la fertilidad (Oettlè, 1998). En caninos se han estudiado los cambios ultraestructurales presentes en las cabezas espermáticas usando MET (Stornelli y col, 2001a). Cuando se compararon los dos métodos de congelación (Congelación en termómetro de nitrógeno vs congelación sobre vapores de nitrógeno líquido) utilizados para criopreservar semen en caninos (Andersen, 1980; Rota, 1998) no se observaron diferencias entre los métodos, y ningún método provocó daño más extenso que el otro, ni mejoró significativamente la calidad espermática al descongelado. Sin embargo en ambos métodos se observaron importantes cambios a nivel de las cabezas en el semen congelado, lo cual puede causar reducida longevidad espermática y explicar las bajas tasas de concepción obtenidas con IA intavaginal en comparación con IA intrauterina cuando se usa semen congelado (Stornelli y col, 2001a; Tsutsui y col, 1989). Estudios dirigidos a caracterizar el tipo y extensión de los cambios ultraestructurales presentes en espermatozoides caninos congelados con diferentes diluyentes podrían ayudar a desarrollar nuevos diluyentes prediciendo en forma más segura la fertilidad de ese semen (Stornelli y col, 2004; Stornelli y col, 2006; Stornelli y col, 2007; Jurado y col, 2008). El semen congelado puede ser almacenado por largo tiempo en bancos de semen y preservar así material genético, es así que un reproductor puede ser usado mucho tiempo después de su muerte.

Inseminación artificial con semen congelado

Tres puntos conforman las llaves del éxito para obtener buenos resultados con la implementación de IA en caninos: 1) Determinación del momento óptimo para la IA, 2) Uso de semen de buena calidad, 3) Uso de una adecuada técnica de IA (Fosberg, 1995).

El semen congelado luego de la descongelación posee una vida mucho más corta que el semen fresco, debido a que los protocolos de criopreservación producen un número potencial de factores de estrés que pueden producir variados cambios en el espermatozoide (Watson, 1990; Watson, 1995). Es así que en caninos, si se usa semen congelado, la IA debe realizarse entre el día 4 y 7 del estro, ya que este es el período óptimo para la concepción. En este momento, el espermatozoide posee altas probabilidades de interaccionar con ovocitos fértiles en relación al tiempo de vida de los mismos (Fosberg CL y Fosberg M, 1989).

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 solo logre una gran población de sobrevivientes sino también la integridad de las células que la conforman (Watson, 1990). En el

perro se estima que entre 150 y 200 X 10⁶ espermatozoides viables al descongelado son necesarios para obtener tasas aceptables de preñez (Johnston, 1991).

Debido a la corta sobrevivencia de los espermatozoides congelados en comparación con el semen fresco, el uso de IA intrauterina aumenta las posibilidades de preñez. La inseminación artificial intrauterina puede realizarse depositando el semen en el útero, a través de la cateterización de cervix o inoculándolo directamente en el cuerpo o cuernos uterinos en forma quirúrgica. 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.

Conclusiones

La utilización de diluyentes que permitan conservar el semen canino refrigerado 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 criopreservación 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 forma parte de los factores que permiten altos porcentajes de preñez y un mayor tamaño de camada. 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 reproductiva diaria.

Bibliografía

- Aisen, E.G; Alvarez, H.L; Venturino, A; Garde, J.J. (2000). "Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents". *Theriogenology*, 53, pp. 1053-1061.
- Aisen, E.G; Medina, V.H; Venturino, A. (2002). "Cryopreservation and post-thawed fertility ram semen frozen in different trehalose concentration". *Theriogenology*, 57, pp. 1801-1808.
- Aisen, E; Cisale, H; Fernández, H. (1990). "Criopreservación de semen ovino". *Nueva técnica: Vet. Arg.*, 63, pp.1.
- Amann, R.P. (1989). "Can be the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately?". *J. Androl.*, 10, pp. 89-98.
- Amann, R.P; Hammersted, R.H. (1993). "In vitro evaluation of sperm quality". *J. Androl*, 14, pp. 397-406.
- Andersen, K. (1972). "Fertility of frozen dog semen". *Acta Vet. Scand.*, 13, pp. 128-134.
- Andersen, K. (1980). "Artificial insemination and storage of canine semen". En Morrow, D.A. (ed.): *Current Therapy in Theriogenology: Diagnosis, Treatment and Prevention of Reproductive Diseases in Animals* (pp. 661-665). USA, Philadelphia: W.B. Saunders.
- Argüelles, J.C. (2000). "Physiological roles in bacteria and yeasts: a comparative analysis". *Arch. Microbiol*, 174, pp. 217-224.
- Arriola, J; Foote, R.H. (1987). "Glycerolation, and thawing effect on bull spermatozoa frozen in detergent-treated egg yolk and whole egg extenders". *J. Dairy Sci.*, 70, pp. 1664-1670.
- Bakas, L.S; Disalvo, E..A. (1991). "Effect of Ca²⁺ on the cryoprotective action of trehalose". *Cryobiology*, 28, pp. 347-353.
- Battista, M; Parks, J; Concanon, P. (1998). "Canine sperm post thaw survival following freezing in straws or pellet using pipes, lactose, tris or test extenders". *Proc. 11th Int. Cong. Anim. Reprod.* (229).
- Bouchard, G.F; Morris, J,K; Sikes, J.D. (1990). "Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoal motility". *Theriogenology*, 34, pp. 147-157.
- Chen, T; Fowler, A; Torner, M. (2000). "Literature Review: Supplemented phase diagram of the trehalose–water binary mixture". *Cryobiology*, 40, pp. 277-282.
- Chupin, D; Schuh, H. (1993). "Survey of a present status of artificial insemination in developing countries". *Wild Anim. Rev.*, 74, pp. 26-35.
- Chupin, D; Thibier, M. (1995). "Survey of the present status of artificial insemination in developed countries". *Wild Anim. Rev.*, 82, pp. 58-68.
- Concannon, P.W; Battista, M. (1989). "Canine semen freezing and artificial insemination". *Current Veterinary Therapy X: Small Animal Practice* (pp. 1247-1259). Philadelphia (United States): Kirk RW.
- Crowe, J.H; Carpenter, J.F; Crowe, L.M; Anchordoguy, T.J. (1989). "Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing

- solutes with biomolecules". *Symposium on cryosensitizing and cryoprotective agents. 26 th Ann. Mtg. Soc. Cryobiol.* (pp. 219-229). California.
- Crowe, J.H; Crowe, L.M; Oliver, A.E; Tsvetkova, N; Wolkers, W; Tablin, F. (2001). "The threalosa myth revisited: Introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state". *Cryobiology*, 43, pp. 89-105.
- Davies, P.R. (1982). "A study of spermatogenesis, rates of sperm production, and methods of preserving the semen of dogs". Doctoral Thesis. University of Sidney.
- England, G.C.W. (1992). "The cryopreservation of dog semen". Doctoral Thesis. Royal College of Veterinary. University of London.
- England, G.C.W. (1993). "Cryopreservation of dog semen". *J. Reprod. Fertil.*, 47, pp. 243-255.
- Fastard, W. (1984). "Bitch fertility after natural mating and after artificial insemination with semen fresh or frozen semen". *J. Small. Anim. Pract.*, 25, pp. 561-565.
- Fastard, W. (1996). "Semen cryopreservation in dogs and foxes". *Anim. Reprod. Sci.*, 42, pp. 251-260.
- Fastard, W. (2000). "Assisted reproductive technology in canid species". *Theriogenology*, 53, pp. 175-186.
- Fontbonne, A; Badinand, F. (1993). "Canine artificial insemination with frozen semen: comparison of the results obtained with an intravaginal and an intrauterine deposition of semen". *J. Reprod. Fertil*, 47, pp. 323-327.
- Fosberg, C.L; Fosberg, M. (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, pp. 299-310.
- Fosberg, C.L; Fosberg, M. (1993). "Results of 527 controlled artificial insemination in dogs". *J. Reprod. Fertil*, 47, pp. 313-323.
- Fosberg, C.L; Strom, B; Govette, G. (1999). "Comparison of fertility data from vaginal vs. intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: a retrospective study". *Theriogenology*, 52, pp. 11-23.
- Fosberg, C.L. (1995). "Artificial Insemination with semen fresh, chilled extended and frozen-thawed semen in the dog". *Seminar in Veterinary Medicine and Surgery*, 10, pp. 48-58.
- Foulkes, J.A. (1977). "The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa". *J. Reprod. Fert.*, 49, pp. 277-284.
- Gao, G.Y; Liu, J; Liu, C; McGann, L.E; Watson, P.F; Kleinhans, F.W; Mazur, P; Critser, E.S; Critser, J.K. (1995). "Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol". *Hum. Reprod.*, 10, pp. 1109-1122.
- Garner, D.L ; Pinkel, D ; Johnson, L.A ; Pace, M.M. (1986). " Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analysis ". *Biol. Reprod.*, 34, pp. 127-138.
- Gill, H.P; Kaufman, C.F; Foote, R.H; Kirk, R.W. (1970). "Artificial insemination of Beagles bitches with freshly collected, liquid stored and frozen-stored semen". *Am. J. Vet. Res.*, 31, pp. 1807-1813.

- Graham, E.F; Rajamannan, A.H.J; Schemehl, M.K.L; Maki-Laurila, M; Bower, R.E. (1971). "Fertility studies with frozen board spermatozoa". *A.I. Digest.*, 19, pp. 6-7.
- Hammerstedt, R.H; Grahan, J.K; Nolan, J.P. (1990). "Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive". *J. Androl.*, 11, pp. 73-88.
- Harrison, R.P.A; Miller, N.G.A. (1998). "Appling flow cytometry to the investigation of live and sperm suspensions". *Proc. BAS Advances topics in andrology. Sperm Biology, New techniques, New Insights.* (pp 1-3).
- Harrop, A.E. (1956). "Artificial Insemination in a bitch with preserved semen". *Brit. Vet. J.*, 110, pp. 424-425.
- Hideki, F; Masashi, I; Takasashi, K. (1993). "Correlation between the hypo osmotic swelling test and various sperm function tests". *Int. Fertil.*, 38, pp. 311-315.
- Holt, W.V; North, R.D. (1991). "Cryopreservation, actin localization and termotropic phase transitions in ram spermatozoa". *J. Reprod. Fert.*, 91, pp. 451-461.
- Holt, C; Holt, W.V; Moore, H.D.M. (1996). "Choice of operating condition to minimize sperm subpopulation sampling bias in the assessment of boar semen by computer assisted semen analysis". *J Androl.*, 17, pp. 587-595.
- Holt, W.V; Morris, G.J; Coulson, G; North, R.D. (1998). "Direct observation of cold-shock effects in ram spermatozoa with the use of a programmable cryomicroscope". *J. Exp. Zool.*, 246, pp. 305-314.
- Irvine, S. (1995). "Computer assisted semen analysis system: sperm motility assessment". *Hum Reprod.*, 10 (1), pp. 53-59.
- Johnston, S.D. (1991). "Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital". *Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.m* 21, pp. 545-551.
- Johnston, D.J; Kuztritz, M.V.R; Olson, P. (2001). "Canine and feline, Theriogenology" (pp. 287-306). Philadelphia (United States): Saunders.
- Juliani, G.C; Snoeck, P.P.N; Henry, M. (2003). "The effect of threalose ou rafinose associated to acetamide/methyelulose on post thaw equine sperm viability". *Braz. J. Anim. Reprod.*, 27, pp. 355-356.
- Jurado, S; Sarmiento, P; Stornelli, M.A. (2008). "La microscopía electrónica como herramienta en la evaluación de semen canino". *Analecta Veterinaria*, 28 (1), pp. 7-14.
- Kawakami, E; Vandevoort, C.A; Mahi-Brown, C.A; Tollner, T.L; Overstreet, J.W. (1993). "Comparison of fluoreseinated lectin stain with triple staining for evaluating acrosome reaction of dog sperm". *J. Exp. Zool.*, 265, pp. 599-603
- Koutsarova, N; Todorov, P; Koutsarov, G. (1997). "Effect of pentoxifyline on motility and longevity of fresh and thawed dog spermatozoa". *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 51, pp. 117-121.
- Larson, B; Rodriguez-Martinez, H. (2000). "Can we use in vitro fertilization tests to predict semen fertility?". *Anim. Reprod. Sci.*, 61, pp. 327-336.
- Luvoni, G.C. (2000). "Current progress on assisted reproduction in dogs and cats: in vitro embryo production". *Reprod. Nutr. Develop.*, 40, pp. 505-512.

- Mahadevan, M.N; Trouson, A.O. (1984). "Relationship of fine structure of sperm head to fertility of frozen human semen". *Fert. Ster.*, 41, pp. 287-293.
- Mazur, P. (1970). "Cryobiology: the freezing of biological system". *Science*, 168, pp. 939-949.
- Mazur, P; Leivo, S.P; Chu, E.H.Y. (1972). "A two-factor hypothesis of freezing injury". *Exper. Cell Res.*, 71, pp. 345-355.
- Mazur, P. (1984). "Freezing of living cells: mechanisms and implications". *Am. J. Physiol.*, 247, pp. 125-142.
- Mendoza, C; Carreras, A; Moos, J; Tsarik, J. (1992). "Distinction between true acrosomal reaction and degenerative acrosome loss by one-step staining method using *Pisum sativum* agglutinin". *J. Reprod. Fertil.*, 95, pp. 755-763.
- Morris, G.J. (1981). "Liposomes as a model system for investigating freezing injury". *Effects of low temperature on biological membranes* (pp. 241-262). London: En Morris, GJ, Clarke A.
- Norton, D.B; Bruce, S.G. (1989). "Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs". *J. Reprod. Fertil.*, 39, pp. 311-316.
- Nothling, J.O; Gerstenberg, C, Volkman, D.H. (1995). "Success with intravaginal insemination of frozen-thawed dog semen". *A retrospective study. J. S. Afr. Vet. Ass.*, 66, pp. 49-55.
- Nothling, J.O; Volkman, D.H. (1997). "Semen quality after thawing: correlation with fertility and fresh semen quality in dogs". *J. Reprod. Fertil.*, 51, pp. 109-116.
- Oettlé, E.E. (1998). "Sperm abnormalities in the dog: a light and electron microscopic study". *Med. Ve. Rev.*, 59, pp. 28-70.
- Paquignon, M.; Bariteau, J.; Boussiere, M.; Courot, M. (1979). "Conservation prolongée du sperm frais du verrant". *Journées Rech. Porcine en France*, 1, pp. 323-328.
- Peña Martínez, Al. (1997). "Supervivencia y fertilidad del semen canino sometido a congelación-descongelación". Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.
- Peña Martínez, Al; Barrio, F; Quintela, L.A; Herradon, P.G. "Proline and glycine betaine in a diluent for freezing canine spermatozoa". *Reprod. Dom. Anim.*, 35, pp. 5-9.
- Peña, A; Forsberg, L.C. (2000). "Effects of Equex, one- or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa". *Theriogenology*, 54, pp. 859-875.
- Pendfold, L.M; Moore, H.D.M. (1993). "A new method for cryopreservation of mouse spermatozoa". *J. Reprod. Fertil.*, 99, pp. 131-134.
- Quinn, P.J; Chow, P.J.W; White, I.G. (1980). "Evidence that phospholipids protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site". *J. Reprod. Fert.*, 60, pp. 403-407.
- Rigau, T ; Farré, M ; Ballester, J ; Mogas, T ; Peña, A ; Rodríguez-Gil, J.E. (2001). "Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates". *Theriogenology*, 56, pp. 801-815.
- Roca, J; Martinez, S; Vazquez, J.M; Lucas, X; Parilla, I; Martinez, E.A. (2000). "Viability and fertility of rabbit spermatozoa diluted in Tris-buffer and stored at 15 °C". *Anim. Reprod. Sci.*, 64, pp. 103-112.

- Rodríguez-Gil, J.E; Montserrat, A; Rigau, T. (1994). "Effect of hypo-osmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa". *Theriogenology*, 44, pp. 885-900.
- Rota, A; Strom, B; Fosberg, C.L. (1995). "Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C". *Theriogenology*, 44, pp. 885-900.
- Rota, A; Strom, B; Fosberg, C.L; Rodríguez-Martínez, H. (1997). "Effects of Equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38° C". *Theriogenology*, 47, pp. 1093-1101.
- Rota, A. (1998). "Studies on preservation, capacitation and fertility of dog spermatozoa." Doctoral Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences.
- Rota, A; Peña, A.I; Fosberg, L.C; Rodríguez Martínez, H. (1999). "In vitro capacitation fresh, chilled and frozen-thawed dog spermatozoa as assessed by the chlortetracycline assay and changes in motility patterns". *Anim. Reprod. Sci.*, 57, pp. 199-215.
- Rowson, L.E.A. (1954). "Infertility of cow, sow and bitch". *Irish Vet. J.*, 8, pp 216-221.
- Saacke, R.G. (1982). "Components of semen quality". *J. Anim. Sci.*, 55, pp. 1-13.
- Saacke, R.G. (1983). "Semen quality in relation to semen preservation". *J. Dairy Sci.*, 66, pp. 2635-2644.
- Salamon, S; Maxwell, W.M.C. (1995). "Frozen storage of ram semen: Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination". *Anim. Reprod. Sci.*, 37, pp. 185-249.
- Seager, S.W.J. (1969). "Successful pregnancies utilizing frozen dog semen". *AI Digest*, 17, pp. 6-7.
- Spallanzani, L. (1776). "Observatione e sperienze in torno ai vercimelli spermetici dell' homo e degli animali". *Opuscoli di fisica animale e vegetabile opuscola. II.*
- Stornelli, M.A; Stornelli, M.C; Arauz, M.S; De la Sota, R.L. (2001a). "Inseminación con semen fresco, refrigerado y congelado". *Aplicación y desarrollo en caninos. Analecta Veterinaria*, 21 (1), pp. 58-66.
- Stornelli, M.C; Stornelli, M.A; Savignone, C; Beluzan, I; Arauz, M.S; De la Sota, R.L. (2001b). "Use of a triple stain technique for simultaneously evaluating of sperm viability and acrosomal status in canine semen". *Brazilian Journal of Animal Reproduction*, 25 (3), pp. 464-466.
- Stornelli, M.A; Stornelli, M.C; Arauz, M.S; Savignone, C.A; García, M; De la Sota, R.L. (2001c). "Estudio comparativo del efecto de tres diluyentes sobre la supervivencia de semen canino almacenado a 4°C". *Revista Brasileira de Reproducción Animal*, 25 (3), pp. 468-470.
- Stornelli, M.A; Stornelli, M.C; Arauz, M.S; Savignone, C.A; García, M; De la Sota, R.L. (2002). "Effects of two different temperatures and three different extenders on survival and longevity of chilled canine semen". *Theriogenology*, 57, pp. 483.
- Stornelli, M.A; Arauz, M.S; Baschard; De LA Sota, R.L. (2003a). "Unilateral and bilateral vasectomy in the dog: Alkaline Phosphatase as an Indicator of Tubular Patency". *Reproduction in Domestic Animals*, 38 (1), pp. 1-4.

- Stornelli, M.A ; Stornelli, M.C ; Savignone, C.A ; Arauz, M.A ; Tittarelli, C ; De la Sota, R.L. (2003b). "Comparison of different concentrations of threalose on viability of frozen-thawed dog spermatozoa". *J. Anim. Reprod*, 27 (3), pp. 359-361.
- Stornelli, M.A. (2004). "Estudios de supervivencia y fertilidad de semen canino criopreservado". Tesis doctoral.
- Stornelli, M.A; Savignone, C; Stornelli, M.C; Tittarelli, C.M; Jurado, S; Giménez, F; De la Sota, R.L. (2006). "Fertility and ultrastructural analysis of frozen-thawed dog spermatozoa with different concentrations of Equex STM Paste". *Theriogenology*, 66, pp. 664-665.
- Stornelli, M.A; Jurado, S.B; Savignone, C.A; Sarmiento, P; Tittarelli, C.M; Stornelli, M.C; De la Sota, R.L. (2007). "Estudios microscópicos y ultramicroscópicos de semen canino fresco y congelado-descongelado con un diluyente tris base con el agregado de trealosa". *Acta Microscópica*, pp. 194-195.
- Strom Holst, B; Rota, A; Andersen Berg, K; Linde Fosberg, C; Rodriguez Martinez, H. (1998). "Canine sperm head damage after freezing-thawing: ultraestructural evaluation and content of select elements". *Reprod. Dom. Anim.*, 33, pp. 77-82.
- Strom Holst, B. (1999). "In vitro characterization of cryopreserved canine spermatozoa with special reference to post thaw survival time and pellucida capacity". Doctoral Thesis.
- Strom Holst, B; Larson, B; Fosberg, L; Rodriguez Martinez, H. (2000a). "Sperm binding capacity and ultrastructure of the zona pellucida of stored canine oocytes". *J. Reprod. Fertil.*, 119, pp. 77-83.
- Strom Holst, B; Larson, B; Fosberg, L; Rodriguez Martinez, H. (2000b). "Evaluation of chilled and frozen –thawed canine spermatozoa using a zona pellucida binding assay". *J. Reprod. Fertil.*, 119, pp. 201-206.
- Tsutsui, T; Shimizu, O; Ohara, N. (1989). "Relationship between the number of sperms and the rate of implantation in bitches inseminated into unilateral uterine horn". *J. Vet. Med. Sci.*, 51, pp. 257-263.
- Vestergén, J; Iguer-Ouada, M; Onclin, K. (2002). "Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice". *Theriogenology*, 57, pp. 149-179.
- Watson, P.F. (1976). "The protection of ram and bull spermatozoa by the low density lipoprotein fraction of egg yolk during storage at 5° C and deep-freezing". *J. Thermal Biol.*, 1, pp. 137-141
- Watson, P.F. (1979). "The preservation of semen in mammals". En Finn. "C.A.Oxford Reviews of Reproductive Biology". England, Oxfor: Oxford University Press.
- Watson, P.F. (1981). "The effects of cold shock on sperm cell membrane". *Effects of low temperatures on biological membranes* (pp. 189-417). Orlando: Morris, G.J.; Clarke, A
- Watson, P.F; Duncan. (1988). "Effect of salt concentration and unfrozen water on the viability of slowly frozen ram spermatozoa". *Cryobiology*, 25, pp. 131-142.

- Watson, P.F. (1990). "Artificial insemination and the preservation of semen". *Marshall's Physiology of Reproduction. 2. Reproduction in the male* (pp. 747-869) Churchill Livingstone: Edinburgo: Lamming, G.E.
- Watson, P.F. (1995). "Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function". *Reprod. Fertil. Dev.*, 7, pp. 781-791.
- Watson, P.F. (2000). "The causes of reduced fertility with cryopreserved semen". *Anim. Reprod. Sci.*, 60-61, pp. 481-492.
- Xia-Zou, C; Ming-Yang, Z. (2000). "Evaluation of sperm quality freshly ejaculated boar semen during in vitro storage under different temperatures". *Theriogenology*, 53, pp. 1477-1488.
- Yanagimachi, R. (1994). "The physiology of reproduction". En: Knobil, E.; Neil, J.D. (eds). *The physiology of reproduction*. 2nd ed. (189-317). New York: Raven Press.
- Yildiz, C; Kaya, A; Askoy, M; Tekeli, T. (2000). "Influence of sugar supplementation of extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing". *Theriogenology*, 54, pp. 579-585.

CAPÍTULO 17

Criopreservación de espermatozoides felinos

María Candela Bonauro

Introducción

La criopreservación de espermatozoides tanto seminales como epididimales y su posterior utilización, mediante IA (inseminación artificial) u otras biotecnologías de generaciones posteriores como fertilización *in vitro* (FIV) e inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) permite gracias al uso de material genético, conservar la biodiversidad de las poblaciones y evitar la extinción de algunas especies amenazadas. Mediante la criopreservación es posible detener el proceso que sufre el espermatozoide desde la eyaculación hasta la fecundación y conservarlo en el tiempo potencialmente fértil (Watson, 1995). Los conocimientos sobre recuperación y criopreservación de espermatozoides epididimales felinos o de eyaculados felinos pueden ser de suma utilidad como modelo experimental para ser utilizado en félidos silvestres en vías de extinción lo que permitirá aumentar sus posibilidades de preservación (Pukazhenthil y col., 2006; Díaz y Ojeda, 2000). Los espermatozoides eyaculados de gato doméstico (Platz y col., 1978) y tigre (Donoghue y col., 1990; Donoghue y col., 1993) han sido eficazmente congelados-descongelados y utilizados mediante IA y fertilización *in vitro* con buenos resultados (Hay y Goodrowe, 1993).

La inseminación artificial (IA) con espermatozoides criopreservados puede ser útil cuando la hembra y el macho se encuentran en lugares distantes o cuando el macho ya no está disponible para el servicio natural. Así mismo esta biotecnología es de gran utilidad en felinos silvestres en vía de extinción (Pushett y col., 2000; Howard, 1999).

Los espermatozoides felinos pueden ser preservados, luego de su recolección, mediante la adición al mismo de un diluyente adecuado y su inmersión en nitrógeno líquido (criopreservación). Luego de la primera comunicación de nacimientos logrados mediante IA con semen felino congelado (Platz y col., 1978), se han realizado variados estudios sobre congelación de semen e IA utilizando semen criopreservado (Platz y col., 1978 Axner y col., 2004; Hermansson y Axner, 2007; Siemieniuch y Dubiel, 2007; Andersen, 1980; Zambelli y col., 2002). El interés por la IA y la criopreservación de semen en felinos ha ido aumentando y ha impulsado el desarrollo e implementación de estas biotecnologías reproductivas. Sin embargo los estudios realizados en este área son escasos y de limitado desarrollo en comparación con la evolución de la criopreservación de semen e IA en otras especies domésticas.

Factores que afectan la viabilidad espermática durante el proceso de criopreservación

Los procesos de criopreservación provocan alteraciones de las membranas y del metabolismo celular así como pérdida de la motilidad espermática, provocando disminución de la fertilidad al descongelado (Hammerstedt y col., 1990; Watson, 1995). Obtener un alto porcentaje de espermatozoides fértiles luego del proceso de congelación-descongelación traerá como resultado un mayor porcentaje de preñez y camadas más numerosas. Este hecho se encuentra íntimamente relacionado con la conservación de la integridad estructural y fisiológica del espermatozoide al descongelado (Held, 1997).

Algunos cambios ocurridos en las membranas que rodean la cabeza del espermatozoide durante la congelación-descongelación son similares a los producidos durante los procesos de capacitación y reducen la longevidad espermática (Paulens, 1993). Las modificaciones térmicas que se producen durante el proceso de criopreservación provocan alteraciones físicas y químicas en las membranas de los espermatozoides (Watson, 1995). Los cambios más evidentes son la pérdida de la motilidad espermática y la pérdida de la integridad acrosómica (Paulens, 1993). Otros factores que modifican la integridad de las membranas (IM) de los espermatozoides son los relacionados con las características físico-químicas de los DIL utilizados, los cuales pueden provocar alteraciones ultraestructurales, bioquímicas y funcionales en la célula espermática (Stornelli y col., 2005). Entre los factores que pueden producir daño sobre los espermatozoides durante los procesos de criopreservación, se encuentran también el estrés térmico, relacionado con los cambios de temperatura (shock de

frío), los efectos tóxicos provocados por los diferentes crioprotectores y la formación de hielo en el medio extra e intra celular (Gao y col., 1993; Gao y col., 1995; Watson, 1976; Watson, 1981; Watson y Duncan, 1988).

Estrés térmico: shock de frío

El enfriamiento realizado de manera rápida o lenta induce en ciertas células un estrés letal, relacionado con un cambio de fase lipídica y alteración de la función de la membrana, por lo que debe realizarse con sumo cuidado. (Watson, 1981; Watson y Duncan, 1988).

Si bien los cambios de fase ocurren generalmente entre los 5°C y 15 °C (Dobrins y col., 1993), el estrés puede continuar por debajo de 0°C. Para disminuir el estrés celular por shock de frío pueden incluirse en el diluyente ciertas sustancias como son la yema de huevo, debido a que los fosfolípidos (Quinn y col., 1980) y las lipoproteínas de baja densidad (Foulkes, 1977) ejercen un efecto protector actuando sobre las membranas estabilizándolas (Watson, 1976).

Crioprotectores y estrés celular

Los crioprotectores permiten mantener una mayor proporción de agua líquida a bajas temperaturas posibilitando la supervivencia celular durante el proceso de criopreservación. Sin embargo, estos compuestos, producen un estrés sobre la membrana plasmática de los espermatozoides. El crioprotector de elección es el glicerol, el cual produce estrés osmótico. Se ha observado que la hiperosmolalidad producida posee un efecto estimulador de la reacción acrosómica (Aitken y col., 1983). La incorporación del glicerol en etapas puede reducir el mencionado estrés (Gao y col., 1993). Se han realizado diferentes trabajos con la incorporación de distintos componentes con el fin de reemplazar en su totalidad o en parte el glicerol. Los componentes utilizados han sido disacáridos, amidas o detergentes; sin obtener un crioprotector que pueda reemplazar en su totalidad al glicerol o reducir su proporción hasta el momento en el gato doméstico (Bonaure y col., 2011; Bonaure y col., 2012; Bonaure y col., 2013 a, b, c).

Formación de hielo en el medio extra e intra celular

La formación de cristales de hielo genera un estrés celular relacionado al aumento en la presión osmótica de la fracción no congelada (Watson, 1995). El tiempo de exposición de las células en este medio debería no ser prolongado para lograr una mayor sobrevivencia, por lo que el

proceso de enfriamiento celular debería ser rápido. Sin embargo la tasa de enfriamiento debe ser lo suficientemente lenta como para permitir la salida de agua intracelular gracias a la presión osmótica extracelular, y prevenir la formación de cristales de hielo en el medio intracelular, lo cual es letal para la célula (Savignone y col., 2007).

Las diferentes poblaciones espermáticas existentes entre especies y dentro de un mismo eyaculado se relacionan con la composición y fluidez de la membrana celular, características que influyen su permeabilidad al agua y a solutos así como su susceptibilidad a la injuria por frío (Hammerstedt y col., 1990).

Protocolos de congelación

Existe una gran variedad de protocolos de congelación los cuales pueden variar entre sí en las tasas de enfriado, congelado-descongelado, en los pasos de dilución realizados, composición del diluyente, momento del empaquetamiento, etc. (Zambelli y col., 2002; Siemieniuch y Dubiel, 2007). Por una cuestión práctica se enumerará a continuación un protocolo de congelación.

Al material seminal (espermatozoides de eyaculado o espermatozoides recuperados de la cola del epidídimo) a congelar se le realizan pruebas de contrastación microscópicas *in vitro* (como motilidad y vigor, porcentaje de espermatozoides vivos, porcentaje de espermatozoides con integridad de membranas plasmática y acrosomal) para determinar la calidad seminal de la muestra. Para realizar la congelación de los espermatozoides felinos se utiliza un DIL el cual se mezcla con un volumen calculado para obtener una concentración final de 50×10^6 espermatozoides/ml. Luego de un tiempo de equilibración de 20 minutos a 4°C (Luvoni, 2008), los espermatozoides diluidos se envasan (empaquetado) en pajuelas de 0,25 ml y se congelan de acuerdo a la técnica descrita por Andersen (Andersen, 1980). La descongelación se realiza a 37 °C durante 15 segundos (Chatdarong y col., 2008). Luego de la congelación y descongelación los espermatozoides deben—ser sometidos a las mismas pruebas de contrastación seminal *in vitro* que se realizaron con el semen fresco para determinar la viabilidad espermática al descongelado.

Diluyentes utilizados para la criopreservación espermática en el gato doméstico

Un DIL que permita obtener altos porcentajes de espermatozoides vivos con motilidad progresiva e integridad acrosómica luego del proceso de congelación-descongelación,

consiguiendo altas tasas de fertilidad *in vivo* precisa contener azúcares como fuente de energía, sustancias buffer que controlen los cambios de pH, antibióticos que eviten el crecimiento bacteriano y crioprotectores que reduzcan la posibilidad de daño de los espermatozoides durante los procesos de congelación y descongelación (Concannon y Battista, 1989).

En la última década, se han estudiado diferentes DIL para la criopreservación de semen felino. Los más utilizados son los que contienen Tris Base (TRIS), con el agregado de distintas sustancias como por ejemplo crioprotectores (glicerol, disacáridos), macromoléculas protectoras de membranas (lipoproteínas de yema de huevo, proteínas de la leche, glicoproteínas), detergentes del grupo alquil-iónico que actúan sobre la yema de huevo, (dodecil sulfato de sodio [SDS]) y azúcares energéticos permeables, capaces de atravesar la membrana plasmática (glucosa) (Axner y col., 2004; Siemieniuch y Dubiel, 2007; Hermansson y Axner, 2007; Chatdarong y col., 2008).

Agregado de disacáridos al DIL

Los azúcares no permeables (trealosa [TREA], lactosa, sacarosa, rafinosa) brindan un medio hipertónico causando deshidratación celular antes de la congelación (Crowe y col., 1989; Crowe y col., 2001). Este efecto osmótico disminuye el agua intracelular congelable y en relación a esto la cuantía de daño celular relacionada con la formación intracelular de cristales de hielo (Aisen y col., 2002). La TREA es un disacárido que posee además una acción protectora relacionada con su interacción específica con los fosfolípidos de membrana durante la desecación y congelación (Crowe y col., 1989; Crowe y col., 2001; Bakas y Disalvo, 1991; Chen y col., 2000) y puede ser capaz de prevenir la separación de fase y la fusión entre las bicapas durante la congelación.

La acción protectora de disacáridos como la trealosa fue observada en especies como el canino y el ovino, sin embargo la acción protectora de este disacárido agregado al diluyente varía según la especie estudiada. En el ovino se logran buenos resultados con el agregado de altas concentraciones de trealosa lo cual causa hipertonía del medio (Crowe y col., 2001; Aisen y col., 2000 ; Molinia y col., 1994). En caninos las concentraciones usadas en ovinos resultan excesivas y producen daños a nivel de la cola espermática afectando la motilidad seminal (Stornelli, 2004). En esta especie, la adición de trealosa en concentraciones que no modifiquen la osmolalidad del diluyente tris base permite ver la acción estabilizadora del disacarido sobre la membrana plasmática. En el gato domestico no se observó efecto protector de la trealosa sobre el semen felino congelado descongelado. Es posible que el semen felino necesite un diluyente con concentraciones de trealosa mayores a las evaluadas sin llegar a concentraciones que produzcan una osmolalidad que afecte la viabilidad

espermática, para que pueda observarse la acción protectora del disacárido (Bonaure y col., 2011; Bonaure y col., 2013).

Agregado de amidas al DIL

Distintos estudios muestran que la adición al DIL de amidas en diferentes concentraciones, en reemplazo de parte del glicerol, permite mejorar parámetros de contrastación seminal *in vitro*, al disminuir los efectos tóxicos del glicerol sobre la célula espermática. Este efecto benéfico ha sido comprobado en equinos y aves (Gomes y col., 2002), no así en caninos (Savignone y col., 2007). Los hallazgos en felinos concuerdan con lo observado en caninos (Dalimata y Graham, 1997; Savignone y col., 2007). Lo observado podría deberse a las diferencias encontradas en la composición lipídica de la membrana espermática en las diferentes especies (Lopes y col., 2009). Debido a que los efectos de los crioprotectores son especie-específicos (Holt, 2000; Peña y Linde-Forsberg, 2000; Rota y col., 2006) es posible que los espermatozoides felinos requieran el reemplazo de un mayor porcentaje de glicerol por amidas para evidenciar los efectos benéficos del agregado de DMF al descongelado (Bonaure y col., 2014).

Agregado de detergentes al diluyente

Los detergentes son capaces de solubilizar y alterar las membranas celulares y sus componentes. Los del grupo alquil-iónico, al cual pertenece el SDS desnaturalizan la estructura nativa de las proteínas de membrana y las disocian en sus cadenas polipeptídicas. Si este detergente se agrega al DIL en pequeñas cantidades, posee un efecto benéfico sobre la motilidad espermática e integridad acrosómica en los procesos de congelación-descongelación (Pursel y col., 1978), gracias a su acción sobre la fracción lipoproteica de baja densidad de la yema de huevo la cual ejerce su acción protectora sobre la superficie celular (Watson, 1976). Compuestos que contengan SDS solo o como un componente del Equex STM paste u Orvus han sido incluidos en los DIL usados para la congelación de semen canino y felino (Pursel y col., 1978; Axner y col., 2004). Sin embargo la adición de altos porcentajes de estas sustancias afecta la estabilidad de la membrana plasmática y acrosomal (Stornelli, 2004). Los resultados observados en felinos permiten arribar a la conclusión de que, un diluyente tris base que posea en su composición el agregado de SDS ejerce un efecto protector mayor que sobre los espermatozoides congelados-descongelados que un DIL tris base sin el agregado de SDS (Bonaure y col., 2012).

Si bien se ha avanzado en el conocimiento y uso de la criopreservación espermática en el gato domestico queda aún un largo camino por recorrer y poder estandarizar los protocolos de criopreservación y permitir el uso corriente de esta biotecnología en felinos.

Bibliografía

- Aisen EG, Alvarez HL, Venturino A, Garde JJ. (2000). "Effect of trehalose and edta on cryoprotective action of ram semen diluents". *Theriogenology*; 53:(1053-61).
- Aisen EG, Medina VH, Venturino A. (2002). "Cryopreservation and post-thawed fertility ram semen frozen in different trehalose concentration". *Theriogenology*; 57 (1801-8).
- Aitken RJ, Wang YF, Liu J, Best F, Richardson DW. (1983). "The influence of medium composition, osmolarity and albumin content on the acrosome reaction and fertilizing capacity of human spermatozoa: development of an improved zona-free hamster egg penetration test". *J Androl.*;6 (180-93).
- Andersen, K. (1980). "Artificial insemination and storage of canine semen". En: Morrow DA (ed). *Current Therapy in Theriogenology: Diagnosis, Treatment and Prevention of Reproductive Diseases in Animals*. (PA. 661-665). W.B. Saunders, Philadelphia.
- Axner F, Hermansson U, Linde Fosberg C. (2004). "The effect of Equex STM paste and sperm morphology on post thaw survival of cat epididymal spermatozoa". *Anim Reprod Sci.* 84 (179-191).
- Bakas LS, Disalvo EA. (1991). "Effect of Ca²⁺ on the cryoprotective action of trehalose". *Cryobiology*; 28 (347-53).
- Bonaura M.C; Praderio, R.; Nuñez Favre, R.; Tittarelli CM, Stornelli, M.A. (2012). "Efecto de la adición de Dimetilformamida a un diluyente Tris base sobre la supervivencia de espermatozoides epididimales felinos pos descongelados". *Terceras Jornadas Internacionales del Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal*. Facultad de Ciencias Veterinarias: Universidad de Buenos Aires. Resolución (CD) N: 1637/120.
- Bonaura MC, Jurado S, Nuñez Favre R, García Mitacek, Sarmiento P, Stornelli MA. (2013). "Anormalidades espermáticas en el gato doméstico (*Felis silvestris catus*)". *12th Inter-American Microscopy Congress*. Cartagena de Indias: Colombia.
- Bonaura MC, Praderio R, Tittarelli MC, Nuñez Favre R, Stornelli MA. (2012). "Efecto de la adición de Dodecil Sulfato de Sodio a un diluyente Tris base sobre la supervivencia de espermatozoides epididimales post descongelación". *XIII Jornadas de Divulgación Técnico Científicas*.
- Bonaura MC., Núñez Favre R., Mansilla Hermann D., Tittarelli C., Stornelli MA. (2011). "Efecto de la adición de trealosa a un diluyente tris base sobre la supervivencia espermática al descongelado en felinos". *Jornada de Jóvenes Investigadores*. Facultad de Ciencias Veterinarias: Universidad de Buenos Aires.
- Bonaura MC; Jurado S; Nuñez Favre R; García Mitacek; Sarmiento P; Stornelli MA. (2013). "Anormalidades espermáticas en el gato doméstico (*Felis silvestris catus*)". *Comité*

Interamericano de Sociedades de Microscopía (CIASEM) y la Asociación Colombiana de Microscopía (ASOCM). Colombia: Cartagena.

- Bonaura, M.C.; Praderio, R.; Nuñez Favre, R.; Tittarelli, C.M.; Stornelli, M.C.; Stornelli, M.A. (2013). "Efecto de la adición de trealosa a un diluyente tris base sobre la supervivencia de espermatozoides epididimales al descongelado en el Gato doméstico (*Felis catus*)". *XIV Jornadas de Divulgación Técnico Científicas*. Facultad de Ciencias Veterinarias: Universidad Nacional de Rosario.
- Chatdarong Thuwanut P, Manee-In S, Lohachit C, Axner E. (2008). "Effects of thawing temperature and post-thaw dilution on the quality of cat spermatozoa". *Anim Reprod Sci*.
- Chen T, Fowler A, Torner M. (2000). "Literature Review: Supplemented phase diagram of the trehalose–water binary mixture". *Cryobiology*; 40 (277-82).
- Concannon PW, Battista M. 1989). "Canine semen freezing and artificial insemination". In: Kirk RW editor. *Current Veterinary Therapy X: Small Animal practice*. (p. 1247-59). Philadelphia PA: WB Saunders.
- Crowe JH, Carpenter JF, Crowe LM, Anchordoguy TJ. (1989). "Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules". *Proceedings of the 26 th Ann. Mtg. Soc. Cryobiol. Symposium on cryosensitizing and cryoprotective agents*. California, USA; (p. 219-29).
- Crowe JH, Crowe LM, Oliver AE, Tsvetkova N, Wolkers W, Tablin F. (2001). "The Trehalose Myth Revisited: Introduction to a Symposium on Stabilization of Cells in the Dry State". *Cryobiology*; 43 (89-105).
- Dalimata AM. Graham JK. (1997). "Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methylcellulose". *Theriogenology*; 49 (831-41).
- Diaz GB, Ojeda RA. (2000). *Libro Rojo de Mamíferos Amenazados de la Argentina*. (p 106). SAREM. Sociedad Argentina para el Estudio de los Mamíferos).
- Donoghue, A. M.; Johnston, L. A.; Seal, U. S.; Armstrong, D. L.; Tilson, R. L.; Wolf, P.; Petrini, L. G.; Simmons, T.; Groos, T. & Wildt, D. E. (1990). "In vitro fertilization and embryo development in vitro and in vivo in the tiger (*Panthera tigris*)". *Biology of Reproduction*, 43, (p. 733-44).
- Donoghue, A. M.; Johnston, L. A.; Armstrong, D. L.; Simmons, L. G. & Wildt, D. E. (1993). "Birth of a siberian tiger cub (*Panthera tigris altaica*) following laparoscopic intrauterine artificial insemination". *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 24 (p. 185-89).
- Drobnis EZ, Crowe LM, Berger T, Anchordoguy TJ, Overstreet JW, Crowe JH. (1993). "Cold shock damage is due to lipid phase-transitions in cell-membranes a demonstration using sperm as a model". *J Exp Zool* 265 (432-437).
- Foulkes JA. (1977). "The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa". *J. Reprod. Fert.*; 49 (277- 284).

- Gao GY, Ashworth E, Watson PF, Kleinhans FW, Mazur P, Critser JK. (1993). "Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride and sucrose on spermolysis". *Biol. Reprod.*; 49 (112-23).
- Gao GY, Liu J, Liu C, McGann LE, Watson PF, Kleinhans FW, et al. (1995). "Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol". *Hum. Reprod.*; 10 (1109-22).
- Gomes GM, Jacob JCF, Medeiros ASL, Papa FO, Alvarenga MA. (2002). "Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the Mangalarga Marchador breed". *Theriogenology*; 58 (277-9).
- Hammerstedt RH, Grahan JK, Nolan JP. (1990). "Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive". *J. Androl.*; 11 (73-88).
- Hay MA and Goodrowe KL. (1993). "Comparative cryopreservation and capacitation of spermatozoa from epididymides and vasa deferentia of the domestic cat". *J Reprod Fert, Suppl*; 47 (297-305).
- Held JP. (1997). "Critical evaluation of the success and role of chilled and frozen semen in today's veterinary practice. Proceedings of the Canine". *Theriogenology*; (p. 49-59).
- Hermansson U, Axnér E. (2007), "Epididymal and ejaculated cat spermatozoa are resistant to cold shock but egg yolk promotes sperm longevity during cold storage at 4 degrees C". *Theriogenology*; 67 (1239-48).
- Holt WV. (2000). "Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences". *Theriogenology*; 53 (47-58).
- Howard JG. (1999). "Assisted reproductive techniques in nondomestic carnivores". In: Fowler ME, Miller RE, editors. *Zoo and wild animal medicine IV*. (p. 449-57). Philadelphia, PA: WB Saunders Co.
- Lopes KRF, Costa LLM, Lima GL, Souza ALP, Silva, AR. (2009). "Dimethylformamide is no better than glycerol for cryopreservation of canine semen". *Theriogenology*; 72 (650-654).
- Lopes KRF, Costa LLM, Lima GL, Souza ALP, Silva, AR. (2009). "Dimethylformamide is no better than glycerol for cryopreservation of canine semen". *Theriogenology*; 72 (650-654).
- Luvoni CG. (2008). "Gamete cryopreservation in the domestic cat". *Theriogenology*; 66 (101-111).
- Molinia FC, Evans G, Caseres PI, Maxwell WMC. (1994). "Effect of monosaccharides and disaccharides in Tris base diluents on motility, acrosome integrity, and fertility of pellets frozen ram spermatozoa". *Anim. Reprod. Sci.*; 36 (113-22).
- Paulens H. (1993). "The structure and function of the sperm membrane in relation to cold shock". *Norw. J. Vet. Med.*; 105 (1135-42).
- Peña A, Linde-Forsberg C. (2000). "Effects of Equex, one- or two step dilution, and two freezing and thawing rates on postthaw survival of dog spermatozoa". *Theriogenology*; 54 (859-875).
- Platz CC, Wildt DE, Seager SW. (1978). "Pregnancy in the domestic cat after artificial insemination with previously frozen spermatozoa". *J Reprod Fert*; 52 (279-82).

- Pukazhenthi B, Laroe D, Crosier A, Bush LM, Spindler R, Pelikaan K, et al. (2004) "Challenges in cryopreservation of Clouded leopard (*Neofelis nebulosa*) spermatozoa". *Proceedings of the 5th International Symposium on Canine and Feline Reproduction*; (P.134-135).
- Pursel VG, Shulman LL, Jonshon LA. (1978). "Effect of Orvus ES paste on acrosomal morphology, motility and fertilizing capacity of frozen thawed board sperm". *J. Anim. Sci.*; 47 (198-202).
- Pushett DA, Lacham-Kapln O, Gunn IM, Trounson AO. (2000). "Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) using epididymal sperm and in vitro-matured oocytes in domestic cat: A model for endangered species". *Theriogenology*; 53 (400).
- Quinn PJ, Chow PJW, White IG. (1980). "Evidence that phospholipids protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site". *J. Reprod. Fert.*; 60 (403-407).
- Rota A, Milani C, Cabianca G, Martini M. (2006). "Comparison between glycerol and ethylene glycol for dog semen cryopreservation". *Theriogenology*; 65 (848–1858).
- Savignone CA, Gimenez F, Nuñez Favre, R, Tittarelli CM, Stornelli MC, de la Sota RL, Stornelli MA. (2007). "Comparison of different concentrations of dimethyl formamide on viability of frozen-thawed dog spermatozoa". *17th Brazilian Congress of Animal Reproduction Curitiva. Anales del congreso* (pp175).
- Siemieniuch M, Dubiel A. (2007). "Preservation of tomcat (*Felis catus*) semen in variable Temperatures". *Anim Reprod Sci.*; 99 (135-44).
- Stornelli MA. (2004). "Estudios de supervivencia y fertilidad de semen canino criopreservado". [tesis doctoral]. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.
- Stornelli MC, Tittarelli CM, Savignone CA, Stornelli MA. (2005). "Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal". *Analecta veterinaria*. 25 (28-35).
- Watson PF, Duncan G. (1988). "Effect of salt concentration and unfrozen water on the viability of slowly frozen ram spermatozoa". *Cryobiology*; 25 (131-42).
- Watson PF. (1995). "Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function". *Reprod. Fertil. Dev.*; 7 (781-91).
- Watson PF. (1981). "The effects of cold shock on sperm cell membrane". (p.189-417). In: Morris GJ, Clarke A, editores. *Effects of low temperatures on biological membranes*. Orlando. Fla.: Academic Press.
- Watson PF. (1976). "The protection of ram and bull spermatozoa by the low density lipoprotein fraction of egg yolk during storage at 5° C and deep-freezing". *J. Thermal Biol.*; 1 (137-41).
- Zambelli D, Canepprle B, Castagnetti C, Belluzzi S. (2002). "Cryopreservation of cat semen in straws: comparison of five different freezing rates". *Reprod Domest Anim.*, 37 (310-313).

CAPITULO 18

Inseminación artificial en caninos

María Alejandra Stornelli

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 (Stornelli 2004, Jewgenow 2012). 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 (Spallanzani, 1776). Fue en 1956 que Harrop logra la primer preñez con semen refrigerado (Harrop, 1960) abriendo las puertas a la criopreservación. Posteriormente, en 1969, se comunica por primera vez una IA satisfactoria con semen congelado (Seager, 1969).

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 cánidos 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.

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 cánidos está íntimamente relacionado con:
- Estado de salud y nutrición de los reproductores.
- Detección del momento de mayor fertilidad de la hembra.
- Tipo, manejo y calidad del semen utilizado.
- 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 afección 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 (Fastard, 2000). 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 (Jhonston y col, 2001). El estudio de extendidos vaginales seriados desde el comienzo del proestro nos permitirá, junto con la imagen vaginoscópica, aproximar el comienzo del estro (Lindsay y col, 1988; Fosberg, 1994, Steckler, 2013). 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 Steckler o de LH es el método más exacto para identificar el pico de LH. Sin embargo, debido al costo, este método no se utiliza rutinariamente (Concannon y col, 1975).

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 (Concannon y col, 1975; Concannon y col, 1977; Concannon, 1997; Steckler 2013). 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 (Fosberg CL y Fosberg M, 1989, Steckler; 2013).

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 (Morrow, 1980; Kirk, 1989; Dumond y Fontbonne, 1993). 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 (Tsutsui y col, 1989; Wilson, 1993).

La significación de las alteraciones morfológicas de los espermatozoides es otro parámetro muy poco estudiado. Algunos autores han comunicado que los defectos espermáticos primarios y secundarios no deben exceder el 30 o 40 % (Feldman y Nelson, 1987; Oettle, 1993). 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 (Morton y Bruce, 1989). 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 (Johnston, 1991). En el semen congelado la motilidad espermática luego del descongelado es el mejor indicador de fertilidad (Morton y Bruce, 1989). La adición de Royal Jelly a diluyentes con Equex STM paste parece tener efectos sinérgicos en la viabilidad espermática al descongelado (Kong y col, 2001). 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 (Tsutsui y col, 2000). 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 (Fosberg CL y Fosberg M, 1989; England y Allen, 1989; Fosberg, 1991).

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.

Inseminación artificial 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 (Fosberg CL y Fosberg M, 1989; England y Allen, 1989; Fosberg, 1991; Fosberg, 1996). 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 % (England y Allen, 1989). Por otra parte implementando IA con semen fresco se obtuvo un porcentaje de preñez de 83,8 % (Morton y Bruce, 1989). 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 (Foto 1; Ettinger y Feldman, 1995). 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 (Johnston, 1991). 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.

Inseminación artificial 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 (Watson, 1995). Los diluyentes protegen a las membranas del espermatozoide del daño causado por los cambios de temperatura, proveen energía y mantienen estables el pH y la osmolalidad (Lardy y Philips, 1939; Marshall y Hugh, 1990). Los antibióticos agregados a los diluyentes evitan la proliferación bacteriana, en especial en los que contienen yema de huevo (Rota y col, 1995).

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 (Morrow, 1980; Kirk, 1989). Algunas experiencias realizadas *in vitro* encuentran mejor conservación del semen en TYH (Rota y col, 1995; Stornelli y col, 2001). 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 % (Fosberg, 1991). 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 (Stornelli y col, 2001; Savignone y col, 2001). 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 %) (Fosberg, 1996).

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 (Dumond y Fontbonne, 1993; Fosberg, 1996). 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.

Inseminación artificial 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 (Morrow, 1980; Kirk, 1989; Morton y Bruce, 1989; England, 1993; Smith, 1986). 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 (Fosberg CL y Fosberg M, 1989; Nothling y Volkman, 1997; Dobrinski y col, 1993; Hori, 2011). 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 (Kirk, 1989; Smith, 1986). La mayoría de los autores logran mejores resultados utilizando inseminación intrauterina (mediante laparotomía, laparoscopia o cateterismo cervical) para el uso de semen congelado (Fosberg, 1991; Silva y col, 1996). Los porcentajes de preñez obtenidos con el uso de inseminación intrauterina varían entre 60% y 90 % (Dumond y Fontbonne, 1993; Wilson, 1993; Nothling y Volkman, 1997; Silva y col, 1996; Fosberg y col, 1999). 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 (Fosberg, 1991; Silva y col, 1996; Fosberg y col, 1999). 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 (Nothling y Volkman, 1993). 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 (Fosberg y col, 1999; Günzel-Apel, 1999; Szász y col, 2000) 4,8 mediante la aplicación de IA intrauterina quirúrgica (Günzel-Apel, 1999) y 4,6 IA vaginal (Nötling y col, 1995). 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 (Watson, 2000; Salamon y Maxwell, 2000; Fastard, 1984; Fastard y Andersen-Berg, 1989). 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 (Watson, 2000). 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 (Tsutsui y col, 1989). En el perro se estima que 200×10^6 espermatozoides viables al descongelado son necesarios para obtener tasas aceptables de preñez (Jhonston y col, 2001).

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 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 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 espermato 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 espermatozoides necesitaremos para lograr la fertilización (Salamon y Maxwell, 2000). 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 (Watson, 2000). 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 (Wilson, 1993; Fosberg, 1991; Silva y col, 1996), aunque algunos autores obtienen buenos resultados con IA intravaginal (Nothling y Volkman, 1993).

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 (Foto 1 y 2). Luego el catéter es retirado y la hembra es mantenida 10 a 15 minutos con el tren posterior sobreelevado (Ettinger y Feldman, 1995).

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 (Marshall y Hugh, 1990).

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; Foto 3). 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 (Fosberg, 1991). La cateterización del cuello puede realizarse visualizando el cérvix con ayuda de un endoscopio (Wilson, 1993; Hayashi K, 2013; Romagnoli, 2014). 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 (Foto 4). Es una práctica sencilla pero el número de inseminaciones es limitado y deben extremarse las medidas para evitar infecciones (Dumond y Fontbonne, 1993; Held, 1997). También puede realizarse mediante laparoscopia, técnica utilizada rutinariamente en ginecología humana. Sin embargo, el costo de los equipos hace que esta técnica haya sido utilizada sólo ocasionalmente (Wildt, 1986).

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

Bibliografía

- Concannon, P.W; Hansen, W; Visek, W.J. (1975). "The ovarian cycle of the bitch: plasma estrogen, LH and progesterone". *Biol. Reprod*, 13, pp.112-121.
- Concannon, PW; Hansen, W; McEntee, K. (1977). "Changes in LH, progesterone and sexual behavior associated with preovulatory luteinization in the bitch". *Biol Reprod*, 17, pp. 604-613.
- Concannon, P.W. (1997). "A review for breeding management and artificial insemination with chilled or frozen semen". *Proceedings of canine reproduction Symposium. American college of theriogenologist*, (pp.1-17).
- Dobrinski, I; Lulai, C; Barth, A.D; Post, K. (1993). "Effects of four extenders and three different freezing rates on postthaw viability of dog semen". *J Reprod Fertil*, 47, pp. 291-296.
- Dumond, C; Fontbonne, A. (1993). "Les indispensables de l' animaux de compagne". (pp. 153-159). Paris (Francia): P.M.C.A.C
- England, GCW; Allen, W.E. (1989). "Seminal characteristics and fertility in dogs". *Vet Rec*, 125, pp.399.
- England, G.C.W. (1993). "Criopreservation of dog semen: A review". *J Reprod Fertil*, 47, pp. 243-255.
- Ettinger, S.J; Feldman, E.R. (1995). "Textbook of Veterinary Internal Medicine". (pp. 1664-1662). United States: Saunders Philadelphia.
- Fastard, W. (1984). "Bitch fertility after natural mating and after artificial insemination with semen fresh or frozen semen". *J Small Anim Pract.*,25, pp. 561-565.
- Fastard, W; Andersen-Berg, K. (1989). "Factors influencing the success rate of artificial insemination with frozen semen in the dog". *J Reprod Fertil.*,39, pp.289-292.
- Fastard W. (2000). "Assisted reproductive technology in canid species". *Theriogenology*, 53, pp. 175-186.
- Feldman, E.C; Nelson, R.W. (1987). "Canine and feline endocrinology and reproduction". (pp. 481-524). United States: Saunders. Philadelphia.
- Fosberg, C.L; Fosberg, M. (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, pp. 299-310.
- Fosberg CL. (1991). "Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen". *Vet Clin North Am*, 21, pp. 467-485.
- Fosberg, C.L. (1994). "Accurate monitory of the estrus cycle of the bitch for artificial insemination. *Proceedings 19th World Congress of the WASAVA* (pp. 601-605).
- Fosberg, C.L. (1996). "Artificial Insemination with semen fresh, chilled extended and frozen-thawed semen in the dog". *Seminar in Veterinary Medicine and Surgery*, 10 (1) pp. 48-58.
- Fosberg, C.L; Strom, B; Govette, G. (1999). "Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: a retrospective study". *Theriogenology*, 52, pp. 11-23.

- Günzel-Apel, A.R. (1999). "Artificial insemination with frozen semen in the bitch: intrauterine insemination techniques". Third conference of the European society for domestic animal reproduction, 6, pp. 71-72.
- Harrop AE. (1960). "Mating natural service and artificial insemination in reproduction in the dog" (pp. 87-89). London (England): Tindall & Cox.
- Hayashi, K; Morita, R; Aso, T; Ono, M; Ohtaki, T; Tanemura, K; Watari, T; Tsumagari, S. (2013). "Evaluation of transcervical insemination using frozen semen by flexible endoscope in dogs". *J Vet Med Sci.*, 75 (3), pp. 315-8.
- Held, J.P. (1997). "Critical evaluation of the success and role of chilled and frozen semen in today's veterinary practice". *Proceedings of canine reproduction Symposium* (pp. 49-59). American college of theriogenologist.
- Hori, T; Matsuda, Y; Kobayashi, M; Kawakami, E; Tsutsui, T. (2011). "Comparison of fertility on intrauterine insemination between cryopreserved ejaculated and cauda epididymal sperm in dogs". *J Vet Med Sci.*, 73 (12), pp. 1685-8.
- Jewgenow, K; Songsasen, N. (2014). "Reproduction and advances in reproductive studies in carnivores". *Adv Exp Med Biol.*, 753, pp. 205-39.
- Jhonston, D.J; Kuztritz, M.V.R; Olson, P. (2001). "Canine and feline theriogenology" (pp. 287-306). United States: Saunders.
- Johnston, S.D. (1991). "Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital". *Vet. Clin. North. Am.*, 21 (3), pp. 545-551.
- Kirk, R.W. (1989). "Current Veterinary Therapy X: Small Animal Practice" (pp. 1247-1259). Philadelphia (United States): Saunders.
- Kong, I.K; Choi, S.G; Bae, H.I; Oh, D.H; Oh, H.J; Kim, H.R; Kin, J.K. (2001). "Effect of addition of royal jelly in tris –buffer extender on the pos –thaw viability of canine semen". *Theriogenology*, 55, pp. 309.
- Lardy, H.A.; Philips, P.H. (1939). "Preservation of spermatozoa". *Proc Am Soc Anim Prod.* 32 *ND Ann Meet*, (pp. 219-231).
- Lindsay, F.E; Jeffcoate, I.A; Concannon, P.W. (1988). "Vaginoscopy and fertile period in the bitch". *Proceedings 11th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination* (pp. 4-565). Dublin.
- Marshall, F; Hugh, A. (1990). "Reproduction in the male in Marshall's physiology of reproduction" (pp. 769-775). New York (United States): Churchil Livingstone.
- Morrow, D.A. (1980). "Current Therapy in theriogenology: Diagnosis, Treatment and Prevention of Reproductive Disease in Animals" (pp. 661-665). Philadelphia (United States): Saunders.
- Morton, D.B; Bruce, S.G. (1989). "Semen evaluation, criopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs". *J Reprod Fertil.*, 39, pp. 311-316.
- Notthling, J.O; Volkman, D.H. (1993). "Effect of addition of autologous prostatic fluids on the fertility of frozen-thawed dog semen after intravaginal insemination". *J Reprod Fertil.*, 47, pp. 325-327.

- Nötling, J.O; Gerstenberg, C; Volkman, D.H. (1995). "Success with intravaginal insemination of frozen-thawed dog semen". *A retrospective study. ASAfr Vet Ass.*, 66 (2), pp. 49-55.
- Nothling, J.O; Volkman, D.H. (1997). "Semen quality after thawing: correlation with fertility and fresh semen quality in dogs". *J Reprod Fertil*, 51, pp. 09-116.
- Oettlé, E.E. (1993). "Sperm morphology and fertility in the dog". *J Reprod Fertil.*, 47, pp. 257-260.
- Romagnoli, S; Lopate, C. (2014). "Transcervical artificial insemination in dogs and cats: review of the technique and practical aspects". *Reprod Domest Anim.*, 4, pp. 56-63.
- Rota, A; Strom, B; Fosberg, C.L. (1995). "Effects of seminal plasma and three extender on canine semen stored at 4°C". *Theriogenology*, 44, pp. 885-900.
- Salamon, S; Maxwell, W.M.C. (2000). "Storage of ram semen". *Anim Reprod Sci.*, 62, pp. 77-111.
- Savignone, C.A; Stornelli, M.A; Stornelli, M.C; Arauz, M.S; De la Sota, R.L. (2001). "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* (pp.165).
- Seager, S.W.J. (1969). "Successful pregnancies utilizing frozen dog semen". *AI Digest.*, 17, pp. 6-7.
- Silva, L.D.M; Onclin, K; Lejeune, B; Vestergen, J.P. (1996). "Comparison of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen". *Vet Rec.* pp.154-157.
- Smith, F.O. (1986). "Update on freezing canine semen, in Kirk RW (ed) Current veterinary therapy IX. (pp. 1243-1248). United States, Philadelphia: BW. Saunders.
- Spallanzani L. (1776). "Observatione e esperienze in torno ai vermicelli spermetici del' uomo e degli animali". *Opuscoli di fisica animale e vegetatile opuscolo. II. Modena.*
- Steckler, D; Nötling, J.O; Harper, C. (2013). "Prediction of the optimal time for insemination using frozen-thawed semen in a multi-sire insemination trial in bitches". *Anim Reprod Sci.*, 142 (3-4), pp. 191-7.
- Stornelli, M.A; Stornelli, M.C; Arauz, M.S; Savignone, C.A; García, M; De la Sota, R.L. (2001). "Estudio comparativo del efecto de tres diluyentes sobre la supervivencia de semen canino almacenado a 4°C". *Revista Brasileira de Reproducción Animal*, 25 (3), pp. 468-470.
- Stornelli, M.A. (2004). "Estudios de supervivencia y fertilidad de semen canino criopreservado". Tesis doctoral.
- Szász, F; Gábor, G; Solti, L. (2000). "Comparative study of different methods for dog semen cryopreservation and testing under clinical conditions". *Acta Veterinaria Hungarica*, 48 (33), pp. 325-333.
- Tsutsui, T; Shimizu, O; Ohara, N. (1989). "Relationship between the number of sperms and the rate of implantation in bitches inseminated into unilateral uterine horn". *J Vet Med Sci.*, 51, pp. 257-263.

- Tsutsui, T; Hase, M; Hori, T; Komoriya, K; Shimizu, N; Nagakubo, K; Kawakami, E. (2000). "Effect of addition of Orvus ES paste to frozen canine semen extender on sperm acrosomes". *J Vet Med Sci*, 62 (5), pp. 537-538.
- Watson, P.F. (1995). "Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function". *J Reprod Fertil*, 7, pp. 781-791.
- Watson, P.F. (2000). "The causes of reduced fertility with cryopreserved semen". *Anim Reprod Sci*, 60, pp. 481-492
- Wildt, D.E. (1986). "Laparoscopy". En Burke T. J. *Small Animal Reproduction and infertility*. (pp. 121-140). United States, Philadelphia: Ed. Lea & Febiger.
- Wilson, M. (1993). "Non surgical intrauterine artificial insemination in bitches using frozen semen". *J Reprod Fertil*, 47, pp. 307-311.

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

Autor		Técnica de IA	Diluyente utilizado	Hembras inseminadas	Porcentaje de preñez	Tamaño de camada
Silva, LDM (1996)		Intrauterina, Laparoscópica	Diluyente (Laiciphos 478, IMV)	5	60%	SDs
Fosberg, (1999)	CL	Intrauterina, Laparoscópica	Diluyente (CLONE)	19	58%	6 ± 2
Fosberg, (1999)	CL	Intrauterina, catéter noruego	Diluyente (CLONE)	167	84%	5,4 ± 3
Fosberg, (1999)	CL	Vaginal	Diluyente (CLONE)	141	59%	4 ± 2,7
Notlinng, (1993)	JO	Vaginal	Triladyl	10	60%	2,4 ± 2,8
Fastard, W (1984)		Intrauterina, catéter noruego	Tris base	30	67%	5,5
Andersen, (1972)	K	Vaginal,	Tris base	8	0%	SD
Andersen, (1972)	K	Intrauterina, quirúrgica	Tris base	1	100%	3
Rota, A (1998)		Intrauterina, transcervical endoscópica	Tris base con 0,5% de Equex STM paste	5	100%	2,2 ± 2,0



Foto 1: Inseminación intravaginal



Foto2: Inseminación intravaginal con semen refrigerado

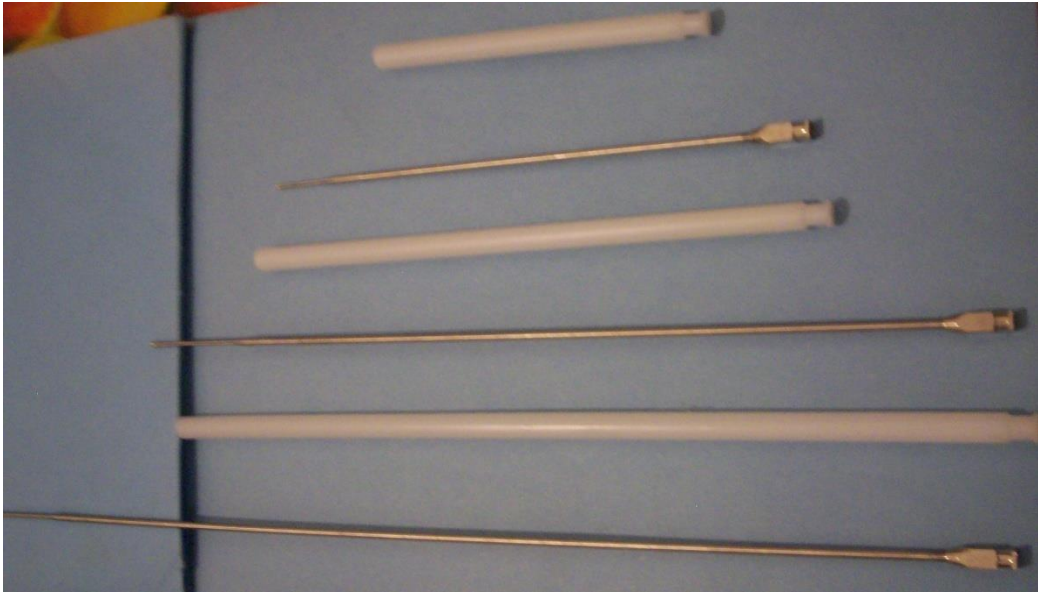


Foto 3: Caterer Noruego, pequeño, mediano y grande.

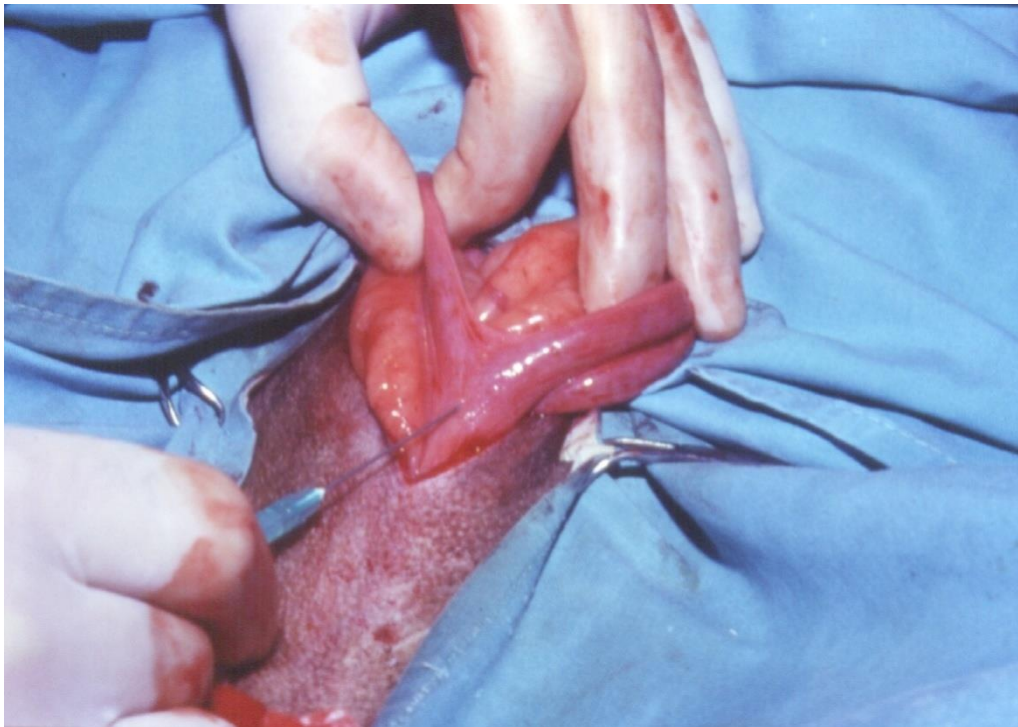


Foto 4: Inseminación intrauterina quirúrgica

CAPÍTULO 19

Inseminación artificial en felinos

María Candela Bonauro

Introducción

La inseminación artificial (IA) es una biotecnología reproductiva que aún no se ha incorporado a la práctica diaria en felinos como si ocurre en los caninos u otras especies de producción. En el gato esta técnica se realiza más frecuentemente en trabajos investigación y muy lentamente va ocupando un lugar en los programas reproductivos. Las particularidades de la fisiología reproductiva así como conductuales de los felinos tales como agresividad, ocurrencia de celos silentes en algunas hembras, ovulación inducida, estacionalidad reproductiva, grandes variaciones individuales entre machos, volumen seminal escaso, alto porcentaje de espermatozoides anormales; son algunas de las temáticas a enfrentar en el momento de pensar en la aplicación de esta biotecnología en el gato.

Inducción de celo y ovulación. Momento de la inseminación

La hembra felina posee ovulación inducida por el coito, solo un pequeño porcentaje de estas (alrededor del 35%) ovulan espontáneamente. Por lo tanto, en ausencia de estímulo coital es necesario inducir la ovulación artificialmente antes de la realización de la IA (Axner, 2008). El protocolo más utilizado para inducir la ovulación es la inyección de hCG (50UI) al tercer o cuarto día del celo realizándose la IA 30 horas después (Zambelli y Cunto, 2005; Chatdarong y col., 2007; Villaverde y col., 2009).

En el caso de gatas en anestro se puede administrar eCG (150 UI, Donoghue y col., 1993; Swanson y col., 1997; Valerie y col., 2009) en una única dosis, seguido de la administración de hCG (50 UI) 5-7 días después a la administración de la eCG. El uso de este protocolo induce desarrollo folicular y ovulación habiéndose comunicado preñeces con la implementación del mismo (Verstegen y col., 1993; Verstegen, 1998).

Protocolos de inseminación

Si la gata es dócil puede realizarse la inseminación sin necesidad de sedación. Si los animales son agresivos puede necesitarse sedación o anestesia. Existen algunos estudios sobre el tipo de protocolo de sedación o anestesia utilizada. Dentro de las drogas anestésicas usadas para la sujeción de los animales Zambelli, comunicó que el uso de anestesia general (AG; medetomidina 0.05 mg/Kg i.m; Ketamina 5 mg/Kg i.v) inhibe la entrada de espermatozoides al útero (Zambelli y Cunto, 2005). Howard indicó que se compromete la ovulación con el uso de AG al utilizar xylazina y ketamina (Howard y col., 1992), en contraposición Tsuitsui y Chatdarong, sugieren que esta no se ve afectada por las drogas mencionadas (Tsuitsui y col., 2000^a; Tsuitsui y col., 2000b; Chatdarong y col., 2007).

Existen diferentes protocolos de IA según el lugar de deposición de semen (intravaginal, IV; intrauterina, IU; intratubal, IT). Así mismo esta técnica puede realizarse con semen fresco o conservado (refrigerado o congelado). Las primeras preñeces obtenidas mediante IA en felinos fueron realizadas en la década del 70' (Sojka y col., 1970; Platz y col., 1978). Recién 30 años después, en 2002, se retomaron los estudios de inseminación artificial en la gata realizándose el depósito de semen en vagina tanto con semen fresco como criopreservado (Tanaka y col., 2000; Tsuitsui y col., 2000^a; Tsuitsui y col., 2000b). Más tarde se incluyó la canulación del cuello uterino (Zambelli y col., 2004). En 2012 se realizó la IA oviductal por laparoscopia obteniendo preñeces con la utilización de bajas cantidades de espermatozoides (Lambo y col., 2012; Swanson, 2012). Tsuitsui, sugiere que las condiciones de capacitación oviductal pueden afectar la fertilización (Tsuitsui, 2006), por lo tanto hay que tener especial recaudo en el momento y lugar óptimo para realizar la IA (Lambo y col., 2012; Swanson, 2012).

En la década del 70' se obtuvieron las primeras preñeces mediante IA en felinos, en estos trabajos se utilizó semen fresco y semen congelado (Sojka y col., 1970; Platz y col., 1978, respectivamente). A partir de estos primeros nacimientos otros investigadores comenzaron años mas tarde a estudiar distintos protocolos de IA, dosis inseminantes tanto de espermatozoides frescos como criopreservados y espermatozoides de origen epididimal en el gato domestico.

IA con semen fresco y criopreservado

Tanaka utilizó 80×10^6 espermatozoides frescos y obtuvo un 80% de preñez con IA IV (Tanaka y col., 2000). Tsutsui logró el mismo porcentaje de preñez utilizando una dosis diez veces menor mediante IA IU unilateral (Tsutsui y col., 2000^a). Howard, obtuvo mediante IA IT un 34,4% de preñez utilizando una dosis inseminante de 6×10^6 espermatozoides (Howard y col., 1992).

Los trabajos realizados por Tsutsui demuestran que se necesita una dosis inseminante 10 veces mayor en la IA IV en comparación con IA IU para obtener tasas de preñez del 80%. El mismo autor observó que para obtener un 57% de preñez se necesitó una dosis inseminante 5 veces mayor de espermatozoides criopreservados en comparación con la dosis utilizada mediante IA con semen frescos (Tsutsui y col., 2000^a; Tsutsui y col., 2000^b). Cuando se comenzó a utilizar esta biotecnología, con el uso de IAIV se obtuvo 10,7% de preñez usando espermatozoides congelados en una dosis inseminante de 50×10^6 espermatozoides motiles en los días 2 y 3 del celo (Platz y col., 1978). Tsutsui logró un 57% de preñez utilizando una dosis inseminante de 50×10^6 de espermatozoides congelados por vía IU (Tsutsui y col., 2000^b).

La inseminación profunda en la gata posee algunas complicaciones ya que no es posible la fijación del cérvix para su canalización, tal como ocurre cuando se realiza en la cateterización de la perra con el catéter noruego (Linde-Forberg y col., 1999; Chatdarong y col., 2002^a; Chatdarong y col., 2002^b; Zambelli y col., 2004). Otro inconveniente en la gata se asocia al pliegue dorsal de la vagina que disminuye el diámetro de la misma durante el estro (Swanson y col., 1994, Chatdarong y col., 2001). Sin embargo Zambelli (2005) logró realizar IA con éxito mediante cateterización transcervical depositando 10×10^6 espermatozoides frescos motiles fresco y 30×10^6 espermatozoides congelados (Zambelli y col., 2005). Esta técnica es ventajosa por ser no quirúrgica y requerir un bajo número de espermatozoides. Resultados obtenidos por Tsutsui demuestran que la IA es posible con semen fresco y semen congelado, y que los espermatozoides son capaces de migrar en el útero pudiendo fecundar ovocitos del ovario contralateral al inseminado (Tsutsui col., 2006).

El primer nacimiento ocurrido luego de la inseminación con espermatozoides epididimales criopreservados fue obtenido mediante IA intrauterina (IU) unilateral logrando una tasa de preñez de 27,3% (3/11) (Tsutsui y col., 2003).

Las tasas de preñez con semen criopreservado aun continúan siendo bajas (Platzy col., 1978; Tsuitsui, 2006), Este hecho podría deberse tanto a las características fisiológicas de la hembra felina como a que aun no se ha logrado un protocolo óptimo para la congelación de espermatozoides en felinos.

La IA intrauterina quirúrgica es una técnica invasiva que requiere el uso de anestesia y la exposición del cuerno uterino en el cual se va a depositar el semen mediante la inserción de una aguja (21G X 1") en la luz del cuerno uterino (Tsuitsui y col., 2010). Los mencionados estudios demuestran que la técnica de elección cuando se utilicen espermatozoides criopreservados es la IA IU.

Conclusión

Podríamos concluir que el uso de un alto número de espermatozoides morfológicamente normales que muestren una buena motilidad (Axner y Linde-Forsberg, 2007) combinado con un correcto protocolo de ovulación y la técnica adecuada de IA permitirá obtener una tasa de preñez aceptable.

Si bien aun no se realiza con frecuencia el uso de la IA en felinos los trabajos anteriormente mencionados han logrado el punto de partida para el avance de esta biotecnología. Aun existe la necesidad de determinar la dosis inseminante en felinos así como de mejorar la viabilidad seminal al descongelado para aumentar la tasa de preñez al utilizar semen congelado.

Bibliografía

- Axner E y Forsberg L. (2007). "Sperm morphology in the domestic cat, and its relation with fertility: a retrospective study". *Reprod Dom Anim* 42 (282-291).
- Axner E. (2008). "Updates on Reproductive Physiology, Genital Diseases and Artificial Insemination in the Domestic Cat". *Reprod Dom Anim*; 43 (144–149).
- Chatdarong K, Axner E, Thuwanut S, Manee-In C, P, Linde-Forsberg C. (2007). "Pregnancy in the domestic cat after vaginal or transcervical insemination with fresh and frozen semen". *Theriogenology*; 68 (1326–1333).
- Chatdarong K, Kampa N, Axner E, Linde-Forsberg C. (2002). "Investigation of cervical patency and uterine appearance in domestic cats by fluoroscopy and scintigraphy". *Reprod Domest Anim*; 37 (275–81).
- Chatdarong K, Lohachit C, Ponglowhapan S, Linde-Forsberg C. (2002). "Transcervical catheterization and cervical patency during the oestrous cycle in domestic cat"s. *J Reprod Fertil Suppl*; 57 (353–6).
- Chatdarong K.; Lohachit C, Ponglowhapan S, Linde-Forsberg C. (2001). "Transcervical catheterization and cervical patency during the oestrous cycle in domestic cats. *J Reprod Fertil Supl*; 57 (353-6).
- Donoghue AM., Johnston LA., Goodrowe KL., O'Brien SJ., Wildt DE. (1993). "Influence of day of oestrus on egg viability and comparative efficiency of in vitro fertilization in domestic cats in natural or gonadotrophin-induced oestrus". *J Reprod Fertil*; 98 (58-90).
- Howard JG, Barone MA, Donoghue AM, Wildt DE. (1992). "The effect of pre-ovulatory anaesthesia on ovulation in laparoscopically inseminated domestic cat". *J Reprod Fertil*; 96 (175–186)..
- Lambo CA, Grahm RA, Lyons LA, Bateman HL, Newsom J and WF Swanson. (2012). "Comparative Fertility of Freshly Collected vs Frozen–Thawed Semen with laparoscopic Oviductal Artificial Insemination in Domestic Cats". *Reprod Dom Anim* 47 (284–288).
- Linde-Forsberg C, Ström Holst B, Govette G. (1999). "Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: a retrospective study". *Theriogenology*; 52 (11–23).
- Platz C. C, Wildt D.E and Seager S. W. (1978). "Pregnancy in the domestic cat after artificial insemination with previously frozen spermatozoa". *J. Reprod. Fert.* ; 52 (279-282).
- Sojka NJ, Jemings LL, Hamner CE. (1970). "Artificial insemination in the cat (*Felis catus* L.)". *Lab Anim Care*; 20 (198–204).
- Swanson WF, Godke R. (1994). "Transcervical embryo transfer in the domestic cat". *Lab Anim Sci*; 44 (288–291).
- Swanson WF. (2012). "Laparoscopic oviductal embryo transfer and artificial insemination in Felids-challenges, strategies and successes. *Reprod Dom Anim* 47 (136-140).

- Swanson WF., Wolfe BA., Brown JL., Martin-Jimenez T., Riviere JE., Roth TL., Wildt DE. (1997). "Pharmacokinetics and ovarian-stimulatory effects of equine and human chorionic gonadotropins administered singly and in combination in the domestic cat". *Biology Reprod*; 57 (295-302).
- Tanaka A, Takagi Y, Nakagawa K, Fujimoto Y, Hori T, Tsutsui T. (2000). "Artificial intravaginal insemination using fresh semen in cats". *J Vet Med Sci*; 62 (1163–1167).
- Tsutsui T, Mizutani T, Matsubara Y, Toyonaga M, Oba H, Hori T. (2010). "Surgical intrauterine insemination with cat semen cryopreserved with orvus es paste or sodium lauryl sulfate". *Theriogenology*; 73 (259-262).
- Tsutsui T, Tanaka A, Takagi Y, Nakagawa K, Fujimoto Y, Murai M, Anzai M, Hori T. (2000a). "Unilateral intrauterine horn insemination of fresh semen in cats". *J Vet Med Sci* 62, (1241–1245).
- Tsutsui T, Tanaka A, Takagi Y, Nakagawa K, Fujimoto Y, Murai M, Anzai M, Hori T. (2000b). "Unilateral intrauterine horn insemination of frozen semen in cats". *J Vet Med Sci* 62, (1247–1251).
- Tsutsui T, Wada M, Anzai M, Hori T. (2003). "Artificial insemination with frozen epididymal sperm in cats". *J Vet Med Sci*; 65 (397–9).
- Tsutsui Toshihiko. (2006). "Artificial insemination in domestic cats (*Felis catus*)". *Theriogenology*; 66 (122–125).
- Valerie J. Wiebe, James P. Howard. (2009). "Pharmacologic Advances in Canine and Feline Reproduction. Topics in Companion Animal Medicine". , (Pages 71–99). Department of Pharmacy, Veterinary Medical Teaching Hospital, and Department of Medicine and Epidemiology, University of California, Davis, CA, USA. Animal Medical Center of Jefferson City, MO, USA.
- Verstegen JP, Onclin K, Silva LD, Donnay I, Mettens P, Ectors F. (1993). "Superovulation and embryo culture in vitro following treatment with ultra-pure follicle-stimulating hormone in cats". *J Reprod Fertil Suppl*; 47 (209–18).
- Verstegen JP. (1998). *Pharmacological control of reproduction in the cat*. (p. 219-226). En: Simpson GM, England GCW, Harvey M, editores. Manual of small animal reproduction and neonatology. United Kingdom, British Associatio.
- Villaverde A.I., Melo C.M., Ian M., Ferreira T.H., Federico O.P, Taconeli C.A., Lopes M.D. (2009). "Comparison of efficiency between two artificial insemination methods using frozen-thawed semen in domestic cat (*Felis catus*). Artificial insemination in domestic cats". *Reprod. Dom Anim*. 47 (136–140).
- Zambelli D, Buccioli M, Castagnetti C and Belluzzi S. (2004). "Vaginal and Cervical Anatomic Modifications During the Oestrus Cycle in Relation to Transcervical Catheterization in the Domestic Cat". *Reprod Dom Anim*; 39 (76–80).
- Zambelli D., Cunto M. (2005). "Transcervical artificial insemination in the cat". *Theriogenology* 64 (698-705).

PARTE V: Afecciones del aparato reproductor

*Romina Nuñez Favre, Romina Praderio, María Carla García
Mitacek, María Cecilia Stornelli, María Alejandra Stornelli*



CAPÍTULO 20

Enfermedades reproductivas del macho

Romina Nuñez Favre-María Alejandra Stornelli

Las afecciones del aparato reproductor del macho son más frecuentes en caninos que en felinos, sin embargo pueden comprometer en ambas especies la capacidad reproductiva del macho por lo cual deben ser consideradas en igual forma en ambas especies.

Afecciones del pene y prepucio:

Afecciones Congénitas:

Frenillo peneano persistente
Hipoplasia peneana
Hipospadias
Deformación congénita del hueso peneano
Duplicación del pene

Afecciones Adquiridas:

Trauma peneano
Neoplasia del pene y prepucio
Prolapso uretral
Fimosis/ Parafimosis
Balanopostitis
Erecciones persistentes/ Priapismo

Afecciones de los testículos y epidídimos:

Afecciones Congénitas:

Criptorquidismo
Hipoplasia testicular

Afecciones Adquiridas:

Neoplasias testiculares
Torsión testicular
Orquitis y epididimitis
Degeneración o atrofia testiculares
Espermatocele, granuloma espermático

Afecciones del escroto:

Dermatitis escrotal
Neoplasia escrotal
Hidrocele
Hernia inguinoescrotal

Afecciones de la próstata:

Hiperplasia prostática benigna
Prostatitis bacteriana aguda y crónica
Metaplasia escamosa
Neoplasias: adenocarcinoma prostático
Quistes prostáticos

Afecciones del pene y prepucio

Anormalidades Congénitas

Los defectos congénitos en perros pueden verse reflejados en camadas de pocos cachorros debido a mortalidad embrionaria o fetal temprana. Se ha observado un aumento de patologías congénitas en perros de raza debido la presión de selección ejercida sobre ciertas características físicas y también debido a consanguinidad (Sargan 2010). El manejo terapéutico de un paciente con defectos congénitos está orientado en las necesidades particulares de cada individuo, con el fin de resolver problemas clínicos. En el caso de que se trate de un futuro reproductor deberá determinarse si alguna de la/las afecciones es de carácter hereditario (Mullan 2010).

Frenillo peneano persistente

El frenillo peneano es una banda fina de tejido conjuntivo que une la parte ventral del glande del pene con el cuerpo del pene o con el prepucio. Se forma por una incompleta disolución del pliegue balanoprepucial, el cual es dependiente de andrógenos. Se ha observado con mayor frecuencia en perros Cocker Spaniel y gatos persas (Axner y col. 1996)

Los signos clínicos incluyen lamido excesivo y dermatitis de la región perineal, falocampsis (curvatura del pene erecto), dolor durante la monta, disminución de la libido e inhabilidad para realizar el servicio (Root Kustritz 2001).

El diagnóstico se realiza por inspección visual del pene protruido. En perros no reproductores el frenillo peneano puede ser asintomático y muchas veces no necesita ser corregido. El tratamiento en casos sintomáticos o en perros reproductores es la sección del frenillo. En los casos en los que el frenillo sea grueso o aparentemente vascular la maniobra se realizará bajo anestesia general (Hutchison 1973, Johnston y col. 2001).

Hipoplasia peneana

La hipoplasia peneana es poco frecuente en caninos, se ha documentado en Cocker spaniel, Collie, Doberman pinscher y Gran Danés. Se encuentra frecuentemente asociada a criptorquidismo y a la ocurrencia de intersexo, aunque también puede observarse en animales castrados a edades tempranas. La hipoplasia peneana suele ser asintomática y constituye un hallazgo durante el examen físico. Si el perro posee además una abertura prepucial hipoplasica puede acumular orina dentro de la cavidad prepucial lo cual predispone a infecciones. El animal

asintomático no requiere tratamiento. Si hay acumulación de orina e infección podría ser necesario el agrandamiento de la abertura prepucial y acortamiento quirúrgico del prepucio (Feldman y Nelson 07; Foto 1).

Hipospadias

La hipospadia es una anomalía del desarrollo en la cual la uretra se abre en ventral y caudal a su localización anatómica normal. Se produce a causa de la fusión incompleta de los pliegues urogenitales durante el desarrollo embrionario pudiendo afectar a ambos sexos. La hipospadia ha sido descrita en animales con intersexo. La etiología aun no se ha determinado, se cree que podría deberse a una respuesta inadecuada o a una producción insuficiente de andrógenos fetales. En la raza Boston terrier se sospecha podría ser hereditaria debido a que posee una alta incidencia (Hayes y Wilson 1986). Frecuentemente se asocian con otras anomalías congénitas del desarrollo, como criptorquidismo, hipoplasia peneana, desviación del pene o desarrollo incompleto del prepucio. (Guimaraes y col. 2013).

En el macho la hipospadia se manifiesta con diferentes grados de deficiencia de la uretra y cuerpo esponjoso, frecuentemente se acompaña con fusión incompleta del prepucio e hipoplasia o ausencia peneana. Se las clasifica según la localización del meato urinario, pudiendo ubicarse desde la punta del pene hasta el periné, como glandular, peneana, escrotal o perineal según el sitio de la apertura uretral (Hayes y Wilson 1986). El diagnóstico puede realizarse durante el examen físico del cachorro o el propietario puede hacer referencia a micción por un orificio inadecuado. Los animales pueden mostrarse asintomáticos o presentar signos de incontinencia urinaria, como dermatitis periuretral, lamido excesivo de la región genital, irritación e inflamación del prepucio, infecciones recurrentes del tracto urinario o problemas durante el servicio (Jurka y col. 2009). En casos en los que la apertura uretral se encuentre en cercanías de la punta del pene se realiza la cirugía para corregir los efectos secundarios como retención urinaria en el prepucio o proteger la punta del pene a causa de un prepucio anormal. Casos más severos de hipospadia conllevan a orquiectomía y uretrotomía (Galanty y col. 2008; Foto 2).

Deformación congénita del hueso peneano

Las deformaciones del hueso peneano pueden producir desviación del pene y signos asociados como imposibilidad para retraer el pene dentro de la vaina prepucial o, predisponer a obstrucciones uretrales. Cuando son leves, el único signo puede ser una aparente infertilidad por incapacidad para lograr la penetración vaginal. El tratamiento intentará corregir la

deformación y los signos asociados a ella. En el caso de que se trate de un reproductor, y la deformación sea leve puede utilizarse la inseminación artificial (Feldman y Nelson 2007).

Duplicación del pene

Es una anomalía congénita muy rara, en la cual se forman dos tubérculos urogenitales. En los casos descritos la duplicación del pene se acompañó de otras anomalías del desarrollo como hidronefrosis, criptorquidismo, duplicación de la vejiga y de la próstata (Johnston y col. 1989). Los signos clínicos se asocian a los del tracto urinario, presentando hematuria, polaquiuria y micción inadecuada (Johnston y col. 2001). En el gato se ha descrito un caso de duplicación de pene asociada a criptorquidismo unilateral (Axner y col. 1996). El diagnóstico se realiza mediante el examen clínico particular.

Afecciones Adquiridas

Trauma peneano/Fractura de pene

Generalmente, los traumatismos peneanos acompañan a traumatismos generales, pero pueden producirse también por mordidas durante peleas y por anillos de pelos o bandas elásticas. También durante el servicio, por flexión no fisiológica del pene o por separación forzada durante la fase de abotonamiento (Johnston y col. 2001, Hicks y col. 2007). Los signos clínicos pueden aparecer inmediatamente al momento del trauma o meses más tarde luego de la no unión de los cabos fracturarios o formación de un callo excesivo o a la formación de tejido fibroso en el sitio de la fractura que desplaza aún más los fragmentos óseos pudiendo obstruir la uretra (Kelly y Clark 1995, Johnston y col. 2001). Los signos clínicos de un traumatismo/fractura aguda incluyen hemorragia (intermitente o continua), lamido excesivo alrededor de la zona afectada y de la cara interna de los miembros posteriores, disuria o hematuria, desviación del pene, distensión de la vejiga y dolor abdominal. Una complicación frecuente de la fractura de pene, es la obstrucción uretral debida a la compresión que ejerce el callo fracturario, la cual puede presentarse 1 a 8 meses postraumatismo, en estos casos de fracturas crónicas los signos incluyen disuria, distensión de la vejiga y desviación ventral del pene (Kelly y Clark 1995, Johnston y col. 2001). El diagnóstico se realiza mediante el examen clínico del paciente y protrusión del pene. En el caso de fractura el diagnóstico definitivo se realiza mediante radiografía. El tratamiento dependerá del grado de daño del tejido blando adyacente, de la presencia de injuria u obstrucción uretral y del grado de desplazamiento de los fragmentos en el caso de fractura. En fracturas simples el tejido blando adyacente provee el soporte adecuado sin necesidad de cirugía. Sin embargo, cuando el desplazamiento de

fragmentos lesiona la uretra se convierte en urgencia quirúrgica, siendo necesario en algunos casos uretrotomía escrotal y amputación de pene (Kelly y Clark 1995, Johnston y col. 2001, Hicks y col. 2007).

Neoplasia del pene y prepucio

La neoplasia con mayor prevalencia es el TVT. También pueden observarse carcinoma de células escamosas en el pene, mucosa prepucial o uretral y mastocitoma.

El **tumor venéreo transmisible** (TVT), se transmite principalmente por exfoliación e implantación de las células tumorales sobre la mucosa peneana durante el coito. En los machos las lesiones suelen localizarse en el glande del pene, en la mucosa prepucial o en el bulbo del glande (Purohit 2008). Una vez implantadas las células tumorales pueden crecer en forma lenta o rápida (Purohit 2008). Los signos clínicos incluyen lamido prepucial, fimosis, descargas prepuciales serosanguinolentas o purulentas si hay compromiso bacteriano del tumor (Johnston y col. 2001). En el examen clínico particular el TVT puede presentarse como nódulos firmes pequeños (1-3mm de diámetro) solos o agrupados, los cuales van agrupándose formando una masa de mayor tamaño, irregular, friable, hemorrágica y pedunculada, adquiriendo la forma típica de coliflor de hasta 7 cm de diámetro. Estas masas siguen creciendo infiltrando la mucosa y submucosa (Purohit 2008). El diagnóstico definitivo se realiza por evaluación citológica de un extendido, impronta o aspiración con aguja fina de la lesión, mediante la observación de la morfología celular típica. El tratamiento de elección es mediante el uso de quimioterápicos como vincristina con buenos resultados y baja tasa de recurrencia (Johnston y col. 2001, Nak y col. 2005, Purohit 2008; Foto 3).

El **Carcinoma de células escamosas** es un tipo de tumor localmente invasivo pero escasamente metastásico. Puede presentarse como nódulos firmes proliferativos o ulcerativos. Histológicamente está formado por células grandes pleomórficas unidas mediante puentes intercelulares (Wakuy y col. 1992). El tratamiento de elección es la escisión quirúrgica (Johnston y col. 2001).

Prolapso uretral

El prolapso uretral canino puede ser idiopático o secundario a excitación sexual o a infección uretral. La predisposición genética es rara. Generalmente afecta a animales jóvenes menores a 5 años de edad. El signo clínico principal es el sangrado intermitente del pene, lamido excesivo, también puede observarse micción frecuente. Al examen clínico puede observarse la mucosa uretral protruida, aunque algunas veces solo puede observarse cuando el pene esta erecto (Johnston y col. 2001; Foto 4). El diagnóstico diferencial debe realizarse

con tumores peneanos como TVT y carcinoma de células escamosas. El tratamiento recomendado es el quirúrgico mediante reducción de la mucosa prolapsada mediante técnicas quirúrgicas y en casos de recurrencia remoción de la porción de uretra prolapsada (O'Connor 2012).

Fimosis/ Parafimosis

La fimosis, incapacidad para protruir el pene a través del orificio uretral, puede ser de origen congénito como en el caso de intersexo o adquirida a causa de anillos de pelos, inflamación, edema o neoplasias que produzcan un estrechamiento del orificio uretral. El tratamiento es quirúrgico (Johnston y col. 2001).

La parafimosis es la incapacidad para retraer el pene dentro del prepucio. Puede ser congénita a causa de una abertura prepucial estrecha, o a un prepucio de largo insuficiente; o adquirida por lamido excesivo debido a trauma/fractura peneana, por estrangulación del pene con bandas elásticas o por un anillo de pelos, balanopostitis, neoplasia, parálisis del músculo retractor del pene o idiopática (Papazoglou 2001). Debe diferenciarse del priapismo en donde la erección continua se debe a trastornos vasculares o nerviosos como en el caso de lesión de disco intervertebral (O'Connor 2012). La parafimosis adquirida se ha observado en perros adultos jóvenes (2-4 años), mientras que la parafimosis congénita es detectada al nacimiento. La mucosa peneana al estar expuesta se seca, inflama, lesiona y cornifica, comprometiéndose cada vez más con el paso del tiempo (Papazoglou 2001). Si la mucosa peneana no está muy afectada se debe limpiar, lubricar y reintroducir el pene en el prepucio. En casos crónicos, en los que la mucosa sufrió trauma severo o necrosis isquémica, es necesaria la amputación peneana (Burrow y col. 2011). La castración no es necesaria debido a que la parafimosis no es una condición hormono-dependiente (Johnston y col. 2001, Papazoglou 2001; Foto 5).

Balanopostitis

La balanopostitis es la inflamación del glande del pene (balanitis) y de la mucosa prepucial (postitis). Puede estar causada por infección bacteriana o viral de agentes oportunistas que pueden o no ser parte de la flora normal, por dermatitis atópica o por automutilación (Johnston y col. 2001).

Dentro de las bacterias de la flora normal prepucial causantes de balanopostitis se encuentran: *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella* sp. como aerobias y micoplasmas y ureaplasmas como anaeróbicos. Mientras que el herpesvirus canino es el principal causante de balanopostitis virales.

Los signos clínicos en infecciones bacterianas incluyen: descarga prepucial purulenta a sanguinopurulenta, de color amarillento-verdoso, con olor fétido. La mucosa prepucial se observa eritematosa pudiendo estar ulcerada. En infecciones virales, la mucosa prepucial presenta lesiones vesiculosas o nodulosas.

El tratamiento se realiza mediante antibioticoterapia sistémica y lavado del pene y prepucio con solución salina tibia en los casos de abundante descarga. Las infecciones producidas por herpesvirus canino son leves y autolimitantes y no poseen tratamiento específico (Feldman y Nelson 2007).

Erecciones persistentes/ Priapismo

El priapismo describe una erección persistente en ausencia de estimulación sexual que dificulta la micción. En un primer momento el pene puede reintroducirse manualmente dentro del prepucio, diferenciándose de esta forma de la parafimosis (Lavelly 2009). En caninos se ha asociado con lesiones espinales (debido estimulación parasimpática del nervio pélvico).

En felinos se ha observado secundariamente a lesiones espinales, o estimulación uretral, prostática, peneana o testicular (se ha descrito como complicación posoperatoria de orquiectomía) (Gunn-Moore y col. 1995).

El diagnóstico se realiza mediante anamnesis completa y examen clínico. Puede intentarse un tratamiento conservador mediante masaje e irrigación de solución salina para favorecer el drenaje sanguíneo y evitar deshidratación de la mucosa peneana. No obstante, para el momento de la consulta, la mucosa peneana generalmente presenta daños severos e irreparables por lo que el tratamiento frecuentemente es la amputación peneana y uretrotomía perineal (Gunn-Moore y col. 1995, Lavelly 2009).

Afecciones de los testículos y epidídimos

Afecciones Congénitas

Criptorquidismo

Es un defecto del desarrollo en el cual uno o ambos testículos no descendieron hasta el escroto. En los caninos los testículos descienden alrededor de los 10 días de vida, manteniéndose móviles dentro del escroto y canal inguinal hasta los 2 meses de edad, momento en el cual deben encontrarse en el escroto. Puede ocurrir un descenso tardío hasta los 6 meses de edad, momento en el que se produce el cierre del anillo inguinal, sin embargo

estos animales pueden transmitir el criptorquidismo a la descendencia por lo cual no deben usarse como reproductores. El criptorquidismo unilateral es más frecuente, y el testículo derecho es el que queda retenido con mayor frecuencia. El/los testículos retenidos pueden encontrarse en cualquier parte del trayecto desde caudal de los riñones hasta el anillo inguinal interno (intrabdominal), o en el canal inguinal (inguinal) o en el tejido subcutáneo prescrotal (extrainguinal), siendo la presentación más común la retención en el canal inguinal. El criptorquidismo canino es hereditario, los genes responsables del descenso testicular son autosómicos recesivos, por lo que puede ser transmitido por ambos progenitores. La incidencia es mayor en las razas pequeñas comparadas con las medianas y grandes.

Los testículos retenidos en abdomen son más pequeños que los retenidos en el canal inguinal. Histológicamente, presentan células de Leydig, células de Sertoli y espermatogonias pero no pueden llevar a cabo la normal espermatogénesis. Sin embargo la esteroidogénesis es normal. Los testículos retenidos están predispuestos a neoplasias (de células de Sertoli y seminomas) y a torsiones testiculares.

El diagnóstico se realiza durante el examen clínico y palpación cuidadosa del escroto y región inguinal en perros mayores a 6 meses de edad.

El tratamiento de elección es la orquiectomía bilateral tanto en animales criptóquidos bilaterales como en unilaterales para evitar la transmisión de este defecto a la descendencia (Johnston y col. 2001). Se puede intentar tratamiento médico en animales menores a 6 meses de edad. Se realiza con GnRH o drogas con actividad LH como hCG, con el fin de lograr el descenso y posterior castración escrotal de los animales, ya que no deben incluirse como reproductores por transmitir este defecto a la descendencia (Feldman y Nelson 2007; Foto 1).

Hipoplasia testicular

La hipoplasia testicular hace referencia a un desarrollo anormal del epitelio germinal en los túbulos seminíferos, caracterizado por la falta o reducción marcada del número de espermatogonias, llevando consecuentemente a azoospermia u oligospermia. Puede ser unilateral o bilateral y se advierte después de la pubertad. Al examen clínico puede observarse un menor tamaño testicular debido a que el volumen testicular se encuentra en estrecha relación con el desarrollo de la hilera seminal. El diagnóstico definitivo se realiza mediante evaluación histológica testicular, en donde pueden observarse túbulos seminíferos subdesarrollados, ausencia de epitelio seminífero y células de Leydig en variable cantidad (Feldman y Nelson 2007; Foto 6).

Afecciones adquiridas

Neoplasias testiculares

Las neoplasias testiculares son frecuentes en los caninos. Los más comunes son el tumor de células de Sertoli, el seminoma y el tumor de células intersticiales o de Leydig. Los tumores testiculares pueden ser unilaterales o bilaterales y la edad promedio de diagnóstico es de 9 años.

Tumor de células de Sertoli. Deriva de las células de Sertoli testiculares. Es el tumor más frecuente en testículos retenidos abdominales o inguinales. El tamaño varía desde <1 cm hasta 12cm, al tacto es firme y color blanco-amarillento. El testículo tumoral aumenta de tamaño y es de consistencia firme y nodular, mientras que el contralateral puede atrofiarse a causa de la producción hormona, compresión o aumento de la temperatura intraescrotal. La tasa de malignidad es baja (2-6%) presentando metástasis a los linfonodos regionales (iliaco, sublumbar e inguinal), pulmón, hígado, bazo, riñón y páncreas (Johnston y col. 2001, Feldman y Nelson 2007). Histológicamente las células tumorales son alargadas con citoplasma eosinófilo y núcleo oval, generalmente se agrupan formando emplazadas rodeadas de tejido fibroso (Grieco y col. 2008). Este tipo de tumor secreta estrógenos por lo que puede observarse síndrome de feminización como síndrome paraneoplásico. Los signos clínicos incluyen alopecia bilateral simétrica, no prurítica, de comienzo en la región perineal y escrotal, diseminándose hacia abdomen por ventral, alcanzando tórax, cuello y flancos. Puede observarse también hiperpigmentación de la piel en la región inguinal, manto hirsuto, ginecomastia, prepucio péndulo, metaplasia escamosa de la próstata, y postura de hembra para orinar (Ortega-Pacheco y Avalos-Borges 2000, Feldman y Nelson 2007). También puede observarse aplasia medular con anemia no regenerativa, mucosas pálidas y letargia, leucopenia, trombocitopenia, petequias en mucosas, epistaxis, hematemesis, melena y hematuria. Los signos de feminización resuelven 21 días posorquiectomía (Johnston y col. 2001, Feldman y Nelson 2007).

El **seminoma** es el tumor de las células germinales testiculares. El tamaño es variable, pudiendo ser desde masas microscópicas hasta masas detectables a la palpación de 6 cm o más de diámetro. Poseen un aspecto nodular, homogéneo a lobulado, de consistencia blanda a la palpación que deforman la túnica albugínea (Baba y Câtoi 2007). Histológicamente las células tumorales son grandes, redondeadas con gran cantidad de citoplasma y núcleo redondo a oval con uno o dos nucléolos evidentes (Grieco y col. 2008). La tasa de malignidad es baja, pero el crecimiento tumoral es rápido y puede producir metástasis a los ganglios regionales, abdomen y tórax. Los signos paraneoplásicos incluyen alopecia no pruriginosa e hiperpigmentación del tronco, enfermedad prostática y diabetes mellitus. Estos signos resuelven posorquiectomía (Johnston y col. 2001).

El **tumor de células intersticiales (de Leydig)** proviene de las células de Leydig testiculares. Se observa con mayor frecuencia en testículos escrotales. Es de tamaño pequeño (<1cm de diámetro) por lo que generalmente no se palpan, sin embargo el testículo contralateral puede estar atrófico. Histológicamente presentan células redondeadas a poligonales con citoplasma eosinofílico finamente vacuolado con núcleo pequeño en donde las figuras mitóticas son raras (Grieco y col. 2008). Generalmente se encuentran en ambos testículos (Johnston y col. 2001).

Torsión testicular/ torsión del cordón espermático

Hace referencia a la rotación del testículo desde 360° hasta varias vueltas. Causa obstrucción del drenaje venoso desde el testículo, con la consecuente congestión y necrosis tisular. No es de presentación frecuente en el perro. La torsión de testículos escrotales es poco frecuente y ocurre en cachorros, siendo los de raza pequeña los más afectados. Los testículos retenidos en abdomen y neoplásicos son los más predispuestos a la torsión debido a su mayor peso y movilidad dentro del abdomen. Los signos clínicos corresponden a los de un abdomen agudo, con dolor abdominal agudo, vómitos, letargia, distensión abdominal, anorexia, miembros posteriores rígidos y negativa para caminar o levantarse, disuria, hematuria y fiebre. Al momento del diagnóstico el testículo que ha sufrido una torsión se encuentra aumentado de tamaño. Esto puede deberse a neoplasia previa con aumento del tamaño o a la oclusión venosa, edema e inflamación producto de la torsión en testículos no neoplásicos. El diagnóstico presuntivo se basa en los signos clínicos, siendo necesaria ecografía abdominal para confirmarlo. El tratamiento es la orquiectomía del testículo afectado y de ambos testículos en el caso de animales criptórquidos debido a la condición hereditaria del criptorquidismo (Johnston y col. 2001, Feldman y Nelson 2007, O'Connor 2012).

Orquitis y epididimitis

La inflamación de los testículos (orquitis) y epidídimo (epididimitis) raramente se encuentran por separado debido a que están estrechamente unidos por el sistema de conductos que unen ambos órganos. Suele presentarse en perros jóvenes. Los signos clínicos en infecciones agudas incluyen, dolor repentino, lamido escrotal, letargia, pirexia y postura antiálgica, pueden estar acompañados de descarga prepucial purulenta y edema escrotal. Las orquiepididimitis pueden ser de origen autoinmune o infeccioso. Las autoinmunes ocurren cuando se destruye la barrera hematotesticular, quedando las células espermatoogénicas más diferenciadas expuestas al sistema inmune, tanto celular como humoral, generando inflamación. Mientras que las de origen infeccioso ocurren generalmente por traumatismos con objetos punzantes, flujo

retrogrado de microorganismos desde próstata o tracto urinario, o diseminación hematógena por bacteriemia. La inflamación aguda induce la formación de microabcesos, y a medida que se vuelve crónica, se produce degeneración, fibrosis y atrofia testicular, y fibrosis epididimal. Los organismos frecuentemente implicados son: *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Brucella canis*, *Mycoplasma canis* y blastomycosis entre otras micosis (Chalker 2005, Kustritz y col. 2005). La brucelosis canina requiere especial atención por tratarse de una enfermedad zoonótica. Todo perro que llegue a consulta con signos de orquiepididimitis debe ser sometido a pruebas diagnósticas para *Brucella canis*. En la práctica se utiliza la prueba rápida de aglutinación con 2-Mercaptoetanol con antígenos de *Brucella canis* M- (menos mucoide) para detectar a los animales serológicamente positivos. Sin embargo para el diagnóstico definitivo de brucelosis debe aislarse la bacteria a partir de hemocultivo. (Johnston y col. 2001, Wanke 2004).

El diagnóstico de orquitis/epididimitis se realiza durante el examen clínico particular, mediante palpación del/los testículos agrandados. En inflamaciones agudas el perro puede resistirse a la maniobra debido al dolor, en el caso de que los testículos puedan palparse estarán aumentados de tamaño y con consistencia firme. En inflamaciones crónicas en las cuales los testículos presenten fibrosis, se palparán firmes e irregulares, mientras que estarán blandos en los casos de atrofia testicular. El diagnóstico diferencial debe hacerse con hernia escrotal, torsión del cordón espermático, neoplasias testiculares, hidrocele, vasculitis y granuloma espermático. Si se ha descartado brucelosis canina, el tratamiento de elección es antibioticoterapia y orquiectomía bilateral en inflamaciones unilaterales o bilaterales. En el caso de perros con elevado valor reproductivo y orquitis unilateral puede realizarse la orquiectomía unilateral (Foto 7).

Degeneración o atrofia testiculares

La degeneración o atrofia testicular se manifiesta con testículos disminuidos de tamaño, de consistencia blanda inicialmente volviéndose firmes a causa de la fibrosis y calcificación distrófica crónica. La degeneración puede ser transitoria si no se han dañado las espermatogonias y las células de Sertoli, o por el contrario, irreversible. Puede observarse como resultado de inflamaciones o neoplasias testiculares o escrotales o incluso pirexia (Johnston y col. 2001). El tratamiento y el pronóstico dependen del origen de la degeneración y de la gravedad del daño en el epitelio seminal. Debe tenerse en cuenta la duración de la espermatogénesis canina antes de definir la degeneración testicular como irreversible.

Espermatocele, granuloma espermático

Los espermatoceles son áreas del epidídimo en donde ocurre oclusión y estasis de espermatozoides. La cual causa inflamación, que se hace crónica y da como resultado la formación de un nódulo fibroso denominado *granuloma espermático*. Pueden producirse a causa de inflamación, traumatismos o anormalidades congénitas (Foley y col. 1995, Johnston y col. 2001). Los granulomas pueden localizarse en cualquier segmento del epidídimo. Las afecciones en la cola ocurren frecuentemente por infecciones ascendentes, mientras que las localizadas en la cabeza ocurren frecuentemente por conductos aferentes ciegos (Foley y col. 1995). En algunos casos pueden palparse durante el examen clínico particular como nódulos pequeños, firmes y no dolorosos. El animal puede presentarse a consulta por infertilidad en la presentación bilateral. La determinación de fosfatasa alcalina se utiliza como marcador de la presencia de líquido epididimario en el eyaculado, por lo que concentraciones reducidas de esta enzima son indicadores de obstrucción unilateral o bilateral (Stornelli y col. 2003). Sin embargo el diagnóstico definitivo se realiza mediante biopsia del tejido afectado (Feldman y Nelson 2007). El pronóstico para animales con alto valor reproductivo con obstrucción bilateral es malo debido a que no existe tratamiento (Johnston y col. 2001, Feldman y Nelson 2007).

Afecciones del escroto

Dermatitis escrotal

Las inflamaciones del escroto pueden o no ser reflejo de enfermedades sistémicas por lo que el examen físico general exhaustivo es recomendado. Las causas de dermatitis escrotales en el perro frecuentemente están relacionadas con traumas, agentes irritantes químicos, infecciones bacterianas, granulomas espermáticos, o también puede ocurrir secundariamente a reacciones alérgicas, como la alergia a las pulgas o atopía (Cerundolo y Maiolino 2002). La inflamación escrotal causa aumento de la temperatura intratesticular y consiguiente disminución de la fertilidad (Johnston y col. 2001). El tratamiento estará orientado en relación a la causa primaria de dermatitis escrotal (Foto 8).

Neoplasias escrotales

Las neoplasias escrotales pueden afectar el escroto como localización primaria o como resultado de metástasis. Frecuentemente se observan neoplasias de piel como: Carcinoma celular escamoso, se presenta como nódulos firmes solitarios circunscriptos, es localmente invasivo. Melanoma, representado por máculas marrones a negras de crecimiento rápido, suelen ser malignos y localmente invasivos. Mastocitomas, aparecen como masas firmes, bien

circunscriptas, eritematosas o ulceradas, son localmente invasivos y suelen metastitizar a los ganglios regionales o pulmones. El tratamiento es la escisión quirúrgica y puede requerirse quimioterapia como terapia adyuvante (Johnston y col. 2001, Cerundolo y Maiolino 2002).

Hidrocele

Es la acumulación de líquido entre ambas capas de la túnica vaginal del escroto. Dentro de las causas descritas de hidrocele se encuentran: compromiso del drenaje linfático debido a neoplasias, orquitis, trauma y torsión testicular o puede ser de origen idiopático. Al examen clínico particular el escroto se presenta agrandado y sin dolor. El tratamiento depende de la causa primaria (Johnston y col. 2001).

Hernia inguinoescrotal

Representan una variante de las hernias inguinales en donde el contenido abdominal atraviesa el anillo inguinal al escroto. No son de presentación frecuente y en la evaluación clínica se observa el agrandamiento escrotal que puede ser firme o fluctuante, puede ser reducible a través del canal inguinal o no y puede o no ser doloroso. El diagnóstico definitivo se realiza mediante palpación cuidadosa y ecografía. El tratamiento es quirúrgico. La fertilidad del animal reproductor debe evaluarse luego de dos meses desde la reducción de la hernia (Johnston y col. 2001).

Afecciones prostáticas

Las enfermedades prostáticas son relativamente frecuentes en el perro e infrecuentes en el gato. La hiperplasia prostática benigna (HPB) es la afección prostática más frecuente en caninos (Foto 9). La metaplasia escamosa se produce por la acción de los estrógenos sobre la glándula y en la actualidad se asocia solo a tumores productores de estrógenos ya que los estrógenos no se usan en protocolos de terapia médica. Dentro de los tumores el de más frecuente presentación es el adenocarcinoma prostático, tumor maligno, no hormonodependiente y de pronóstico grave. Ocasionalmente puede observarse una estructura similar a una vejiga urinaria en relación a la cara dorsal de la próstata. Esta estructura es denominada quiste paraprostático y desarrolla a partir de restos del útero masculino. Puede contener un líquido hemorrágico o purulento. El quiste puede estar o no conectado con la próstata predisponiendo, en este último caso, a infecciones prostáticas y/o urinarias recidivantes. El quiste paraprostático se extrae quirúrgicamente y en general tiene buen

pronóstico (Foto 10). Realizaremos una descripción más detallada de la HPB por ser la afección prostática más frecuente

Hiperplasia prostática benigna

La hiperplasia prostática benigna es una afección frecuente en caninos enteros. Los perros y los humanos son las únicas especies que presentan HPB. En el hombre el aumento del tamaño glandular se produce principalmente

a expensas del estroma, a diferencia del perro en el cual involucra principalmente a las células epiteliales glandulares (Zirkin 1984, La Roque 1995, Carlin 1996). Es así que el perro ha sido usado como modelo experimental para el humano en el estudio de esta afección. La HPB puede comenzar a edad temprana (entre 1 y 2 años de edad) grupo etario en el cual se ha comunicado una incidencia del 16%, siendo más frecuente entre los 6 y 9 años. Aproximadamente 95% de los machos no castrados presentan HPB a los 9 años. Sin embargo, la mayoría no llegan a desarrollar signos clínicos apreciables por el propietario (Smith 2008, Verstegen 2001).

La secreción de la glándula prostática forma parte del plasma seminal, el volumen de la misma se relaciona con el tamaño y funcionalidad de la glándula. Así en la glándula normal el volumen de secreción producido aumenta con el tamaño de la próstata. Por el contrario la glándula prostática hiperplásica aumenta su tamaño pero disminuye su capacidad secretoria (Stornelli 2001, Feldman y Nelson 1996).

Se ha comprobado que la edad, así como las hormonas testiculares y por lo tanto la presencia de testículos endocrinológicamente funcionales son prerequisites importantes en el desarrollo de la fisiopatología de esta alteración (Juniewicz 1990). La Dihidrotestosterona (DHT), metabolito activo de la testosterona, es considerada el principal andrógeno asociado a la patogénesis de la HPB. La testosterona circulante es convertida dentro de las células epiteliales prostáticas en DHT por acción de la 5 α reductasa. La DHT se une a los receptores nucleares de las células epiteliales prostáticas con mayor afinidad que la testosterona y regula el crecimiento de la glándula (Iguer-Ouada 1995, Kamolpatana 2000, Smith 2008).

Signología clínica: La HPB es una afección frecuente en canino. Si bien muchos pacientes son asintomáticos otros presentan signos asociados a afección prostática. La HPB puede ocasionar disminución de la eficiencia reproductiva, medorrea sanguinolenta independiente de la micción, disuria y actuar como factor predisponente para la ocurrencia de prostatitis bacteriana e infecciones urinarias recidivantes (Cohen 1995, Johnston 2000, Smith 2008). A la palpación rectal puede detectarse, por delante del pubis, una glándula prostática aumentada de tamaño en forma leve, moderada o importante, simétrica o asimétrica y no dolorosa. Si el aumento de la próstata es importante, la glándula puede caer hacia el abdomen

y no ser palpable mediante palpación rectal pero si mediante palpación abdominal en epigastrio o mesogastrio según el tipo de agrandamiento y desplazamiento glandular (Stornelli 2002). El estudio radiográfico y ecográfico permiten obtener datos sobre el tamaño y posición de la próstata (Atalan 1996, Finn 2001, Jhonston 2001). La ultrasonografía permite obtener datos del parénquima glandular pudiendo observarse la presencia o no de quistes. El estudio citológico de la tercera fracción del eyaculado permite aproximar el diagnóstico. La obtención de una muestra para biopsia en fona ecodirigida y la realización de un estudio histopatológico permite arribar a diagnóstico definitivo. Si bien la estearasa prostática se encuentra aumentada en pacientes con HPB, también aumenta en otras enfermedades prostáticas, hecho que le quita valor diagnóstico a esta determinación de laboratorio (Klausner 1995).

Tratamiento: La castración es el tratamiento de elección para machos no utilizados en programas reproductivos. Diversas estrategias terapéuticas para inhibir la producción de andrógenos o su acción sobre la próstata han sido estudiadas. Algunos fármacos utilizados en décadas pasadas [inhibidores de receptores para andrógenos (Flutamida) o agonistas GnRH] comprometen la libido y/o la capacidad funcional testicular por lo cual no son de utilidad en un macho reproductor (Cohen 1995, Renggli 2010, Poliska 2013).

Finasteride es un inhibidor específico de la 5 α reductasa e impide la conversión de la testosterona en DHT, no posee propiedades androgénicas, estrogénicas ni progestágenas, ni afinidad por los receptores androgénicos (Krawiec 1992, Larroque 1995, Murakoshi 2000). En humanos y caninos se ha demostrado su eficacia en el tratamiento de la HPB sin alterar la libido ni la capacidad reproductiva (Carlin 1996, Stornelli 2002, Lévy 2014). El uso de 0,1 mg/kg de Finasteride día permite lograr una reducción del 40% del tamaño inicial de la glándula después de 10 semanas de tratamiento (Stornelli 2002).

El acetato de Osaterona es un potente antiandrógeno que desplaza a la dihidrotestosterona de los receptores prostáticos para andrógenos ha mostrado ser efectivo para el tratamiento de HPB. Se utiliza por vía oral a dosis de 0,25-0,50 mg/kg/día durante 7 días consecutivos. el tratamiento se repite cada 6 meses. No se han observado cambios pH seminal ni en la motilidad del espermática en perros tratados con acetato de osaterona por lo que puede ser una opción para tratar a perros reproductores (Tsutsui 2001, Albouy M 2008, Renggli 2010, Lévy 2014). A diferencia del Finasteride la Ozaterona no se encuentra disponible en Argentina.

La HPB altera la arquitectura glándulas y predispone a la ocurrencia de prostatitis bacteriana. Las mencionadas alteraciones son una causa frecuente de subfertilidad o infertilidad en el canino macho. Estos hechos hacen importante considerar tratamientos médicos que permitan el manejo de la enfermedad prostática y no afecten ni la libido ni la producción y calidad espermática.

Bibliografía

Albouy M, Sanquer A, Maynard L, Eun HM. (2008). Efficacies of osaterone and delmadinone in the treatment of benign prostatic hyperplasia in dogs. *Vet Rec.* 9;163(6),179-83.

Atalan, G.; Barr, F.J.; Holt, P.E. (1999). "Comparison of ultrasonographic and radiographic measurements of canine prostate dimensions". *Veterinary Radiology & Ultrasound* 40 (4), pp. 408-412.

Axner, E.; Strom, B.; Linde-Forsberg, C.; Gustavsson, I.; Lindblad, K. y Wallgren, M. (1996). "Reproductive disorders in 10 domestic male cats." *J Small Anim Pract* 37 (8), pp. 394-401.

Burrow, R. D.; Giejda, A. A.; Gregory, S. P. y White, R. N. (2011). "Penile amputation and urethrostomy in 18 dogs." *Veterinary Records*

Carlin, J.R., Christofalo, P.; Arison, B.H.; Ellsworth, R.E.; Rosegay, A.; Miller, R.; Chiu, S.H.; Vandenheuel, W.J.A. (1996). "Disposition and metabolism of Finasteride in dogs" 25 (1), pp. 100-109.

Cerundolo, R. y Maiolino, P. (2002). "Review cutaneous lesions of the canine scrotum." *Vet Dermatol* 13 (2), pp. 63-76.

Cohen, S.M.; Werrmann, J.G.; Rasmusson, G.H.; Tanaka, W.K.; Malatesta, P.f.; Prahalada, S.; Jacobs, J.G.; Harris, G.; Nett, T.M. (1995). "Comparison of the effects of new specific Azateroid inhibitors of steroid 5 reductase on canine hiperplastic prostate: suppression of prostatic DHT correlated with prostate regression". *The prostate.* 26, pp. 55-71.

Chalker, V. J. (2005). "Canine mycoplasmas." *Res Vet Sci* 79 (1), pp. 1-8.

Feldman, E.; Nelson, R. (1996). "Prostatic disease in canine and feline endocrinology and reproduction". 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders. (pp. 741-768).

Feldman, E. y Nelson, R. (2007). *Endocrinología y Reproducción Canina y Felina.* (Taibo, D.). (Tercera). Buenos Aires: Inter-Médica.

Finn-Bodner, S.T. (2001). "Reproductive tract sonography of the dog and cat". *Proceedings of Annual Conference and Canine Symposium.* Vancouver, Canada. (pp. 217-326).

Foley, G. L.; Bassily, N. y Hess, R. A. (1995). "Intratubular spermatid granulomas of the canine efferent ductules." *Toxicol Pathol* 23 (6), pp. 731-734.

Galanty, M.; Jurka, P. y P., Z. (2008). "Surgical treatment of hypospadias. Techniques and results in six dogs." *Polish Journal of Veterinary Sciences* 11 (3), pp. 235-243.

Grieco, V.; Riccardi, E.; Greppi, G. F.; Teruzzi, F.; Iermano, V. y Finazzi, M. (2008). "Canine Testicular Tumours: a Study on 232 Dogs." *J. Comp. Path.* 138 86-89.

Guimaraes, L. D.; Bourguignon, L. C.; Santos, L. C.; Duarte, T. S.; Andrade, E. C. y Borges, A. P. B. (2013). "Canine perineal hypospadias." *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia* 65 (6), pp. 1647-1650.

Gunn-Moore, D. A.; Brown, P. J.; Holt, P. E. y Gruffydd-Jones, T. J. (1995). "Priapism in seven cats." *J Small Anim Pract* 36 (6), pp. 262-266.

- Hayes, H. M., Jr. y Wilson, G. P. (1986). "Hospital incidence of hypospadias in dogs in North America." *Vet Rec* 118 (22), pp. 605-607.
- Hicks, D. G.; Bagley, R. S.; Gavin, P. R.; Holmes, S. P. y Tibary, A. (2007). "Imagin diagnosis--corpus cavernosum, ischiocavernosus, an bulbospongiosus muscle injury in a dog." *Vet Radiol Ultrasound* 48 (3), pp. 239-242.
- Hutchison, J. A. (1973). "Persistence of the penile frenulum in dogs." *Can Vet J* 14 (3), pp. 71.
- Iguer-Ouada, M.; Verstegen, J.P. (1997). "Effect of Finasteride (Proscar MSD) on seminal composition, prostate function and fertility in male dogs". *Journal of reproduction supplement* 51, pp. 139-149.
- Johnston, S.D.; Kamolpatana, K.; Root-Kustritz, M.V.; Johnston, G.R. (2000). "Prostatic disorders in the dog". *Animal Reproduction Science* pp. 405-415.
- Johnston, S. D.; Bailie, N. C.; Hayden, D. W.; Johnston, G. R. y Osborne, C. A. (1989). "Diphallia in a mixed-breed dog with multiple anomalies." *Theriogenology* 31 (6), pp.
- Johnston, S. D.; Root Kustritz, M. y Olson, P. (2001). *Canine and Feline Theriogenology*. (1st.). Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- Juniewicz, P.E.; Barbolt, T.A.; Egy, M.A. (1990). "Effect of androgen and antiandrogen treatment on canine prostatic arginine esterase". *Prostate* 17, pp. 101-111.
- Jurka, P.; Galanty, M.; Zielinska, P.; Max, A. y Sysa, P. (2009). "Hypospadias in six dogs." *Vet Rec* 164 (11), pp. 331-333.
- Kamolpatana, K.; Johnston, S.D.; Hardy, S.K.; Castner, S. (1998). "Effect of Finasteride on serum concentrations of dihydrotestosterone in three clinically normal sexually intact adult male dogs". *AJVR* 59, pp. 762-764.
- Klausner, J.S.; Johnston, S.D.; Bell, F.W. (1995). "Canine Prostatic Disorders". En Kirk, R.W.; Bonagura, J.D. Ed. W.B. Saunders Company. (pp. 1103-1110).
- Krawiec, D.R.; Heflin, D. (1992). "Reports of retrospective studies: study of prostatic disease in dogs: 177 cases (1981-1986). *J Am Vet Med Ass* 200, pp. 1119-1122.
- Kelly, S. E. y Clark, W. T. (1995). "Surgical repair of fracture of the os penis in a dog." *J Small Anim Pract* 36 (11), pp. 507-509.
- Kustritz, M. V.; Johnston, S. D.; Olson, P. N. y Lindeman, C. J. (2005). "Relationship between inflammatory cytology of canine seminal fluid and significant aerobic bacterial, anaerobic bacterial or mycoplasma cultures of canine seminal fluid: 95 cases (1987-2000)." *Theriogenology* 64 (6), pp. 1333-1339.
- Laroque, P.A.; Prahalada, S.; Gordon, L.R.; Molo Noblot, S.; Bagdon, W.J.; Duprat, P.; Peter, C.P.; Van Zwieten, M.J. (1994). "Effects of chronic oral administration of a selective 5-reductase inhibitor, Finasteride, on the dog prostate". *The prostate* 24, pp. 93-100.
- Laroque, PA.; Prahalada, S.; Molo Noblot, S.; Cohen, SM.; Soper, K.; Duprat, P.; Peter, CP.; Van Zwieten, MJ. (1995). "Quantitative evaluation of glandular and stromal compartments in hiperplasia dog prostates: effect of 5 –reductase inhibitors". *The prostate* 27, pp. 121-128.

- Lavelly, J. A. (2009). "Priapism in dogs." *Top Companion Anim Med* 24 (2), pp. 49-54.
- Lévy X, Nizański W, von Heimendahl A, Mimouni P. (2014). *Reprod. Domest Anim.* 49, (2), 50-7. Diagnosis of common prostatic conditions in dogs: an update.
- Mullan, S. (2010). "The Ethics of the Management of Diseases Present at Birth: Individuals versus Populations". En *Surgeons, A. o. V. S. T. Congenital and Hereditary Diseases of Dogs and Cats* (16-20).
- Murakoshi, M.; Tagawa, M.; Ikeda, R.; Nakayama, T.; Ishimura, K. (2000). "Immunolocalization of androgen receptor (AR) and steroid 5 – reductase type II (5 – reductase type II in canine prostate. Effect of antiandrogen, clormadinone acetate (CAM)". *Acta Histochem. Cytochem* 33 (3), pp. 139-229.
- Nak, D.; Nak, Y.; Cangul, I. T. y Tuna, B. (2005). "A Clinico-pathological Study on the Effect of Vincristine on Transmissible Venereal Tumour in Dogs." *J. Vet. Med. A* 52 366-370.
- O'Connor, C. (2012). "Male Reproductive Emergencies". En *27 WASAVA Congress Granada, Spain*:
- Ortega-Pacheco, A. y Avalos-Borges, E. (2000). "Hiperestrogenismo, alopecia y metaplasia escamosa de próstata asociados a un tumor de células de Sertoli en un perro." *Rev Biomed* 11 (1), pp. 33-38.
- Papazoglou, L. G. (2001). "Idiopathic chronic penile protrusion in the dog: a report of six cases." *Journal of Small Animal Practice* 42 510-513.
- Polisca A, Orlandi R, Troisi A, Brecchia G, Zerani M, Boiti C, Zelli R. (2013). Clinical efficacy of the GnRH agonist (deslorelin) in dogs affected by benign prostatic hyperplasia and evaluation of prostatic blood flow by Doppler ultrasound. *Reprod Domest Anim.* 48(4), 673-680.
- Purohit, G. (2008) "Canine Transmissible Venereal Tumor: A Review." *The Internet Journal of Veterinary Medicine* [en línea]. Consultado el en.
- Renggli M, Padrutt I, Michel E, Reichler I. (2010). Benign prostatic hyperplasia: treatment options in the dog. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 152(6), 279-84.
- Root Kustritz, M. (2001). "Disorders of the canine penis." *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 31 (247-258), pp.
- Sargan, D. (2010). "Inherited and Congenital Disease – a Geneticist's View". En *Congenital and Hereditary Diseases of Dogs and Cats*
- Smith, J. (2008). "Canine prostatic disease: A review of anatomy, pathology, diagnosis, and treatment". *Theriogenology.* 70, pp. 375-383.
- Stornelli, MC.; Savignone CA.; Rodriguez, RR.; Scodellaro, C.; Dragonetti, AM. (2001). "Efecto del finasteride sobre el volumen prostático en caninos machos". *Memorias de las Jornadas de Divulgación Técnico científica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Casilda. Santa Fé.* pp. 48.
- Stornelli, MA.; Stornelli, MC.; Rodriguez, RR.; Scodellaro, C.; Savignone, CA. (2002). "Acción de finasteride sobre el volumen prostático en caninos con hiperplasia prostática". *Analecta Veterinaria.* 22, pp. 53-57.

Stornelli, M. A.; Arauz, M. S.; Baschard, H. y de la Sota, R. (2003). "Unilateral and bilateral vasectomy in the dog: Alkaline Phosphatase as an Indicator of Tubular Patency." *Reproduction in Domestic Animals* 38 (1), pp. 1-4.

Tsutsui T, Hori T, Shimizu M, Tatsuzawa C, Kawakami E. (2001). Effect of osaterone acetate administration on prostatic regression rate, peripheral blood hormone levels and semen quality in dogs with benign prostatic hypertrophy. *J Vet Med Sci.* 63(4), 453-6.

Vestergren, J.; Onclin, K. (2001). "The ovarian cycle and oestrus induction in the bitch, Postate disease in the male dog". *Proceedings of Annual Conference and Canine Symposium.* Vancouver, Canada. pp. 283-293.

Wakuy, S.; Furusato, M.; Nomura, Y.; Iimori, M.; Kano, Y.; Aizawa, S. y Ushigome, S. (1992). "Testicular Epidermoid Cyst and Penile Squamous Cell Carcinoma in a dog " *Vet Pathol* 29 543-545.

Wanke, M. M. (2004). "Canine brucellosis." *Anim Reprod Sci* 82-83 195-207.

Zirkin, BR.; Strandberg, JD. (1984). "Quantitative changes in the morphology of the aging canine prostate". *Anat. Rec.* 208, pp. 207-214.



Foto 1: Hipoplasia peneana y criptorquidismo bilateral.



Foto 2: Hipospadia.



Foto 3: Tumor venéreo transmisible canino



Foto 4: Prolapso uretral



Foto 5: Parafimosis

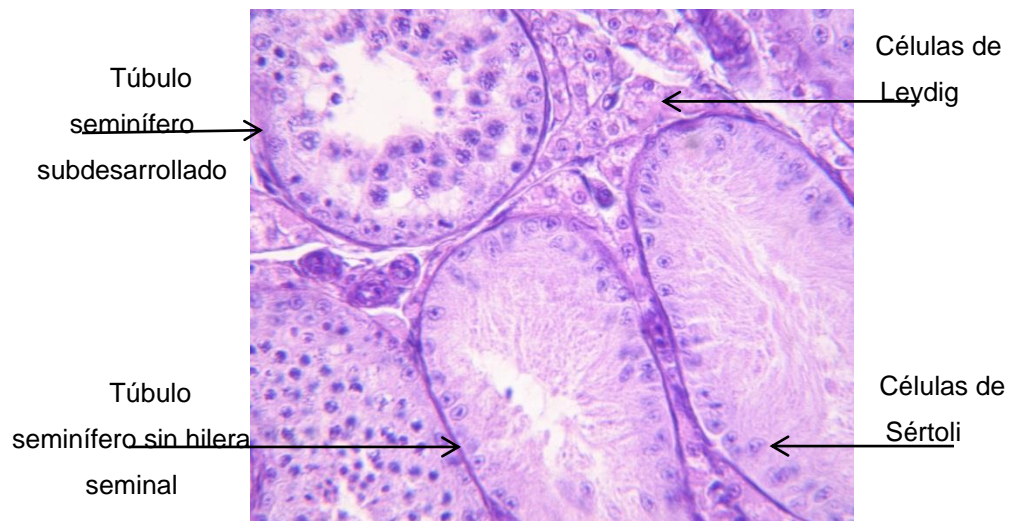


Foto 6: Hipoplasia Testicular

Fotomicrografía de un corte histológico de testículo felino hipoplásico. Pueden observarse túbulos seminíferos subdesarrollados y otros no desarrollados conteniendo solamente células de Sertoli. En el espacio intersticial pueden observarse abundante cantidad de células de Leydig (40x).

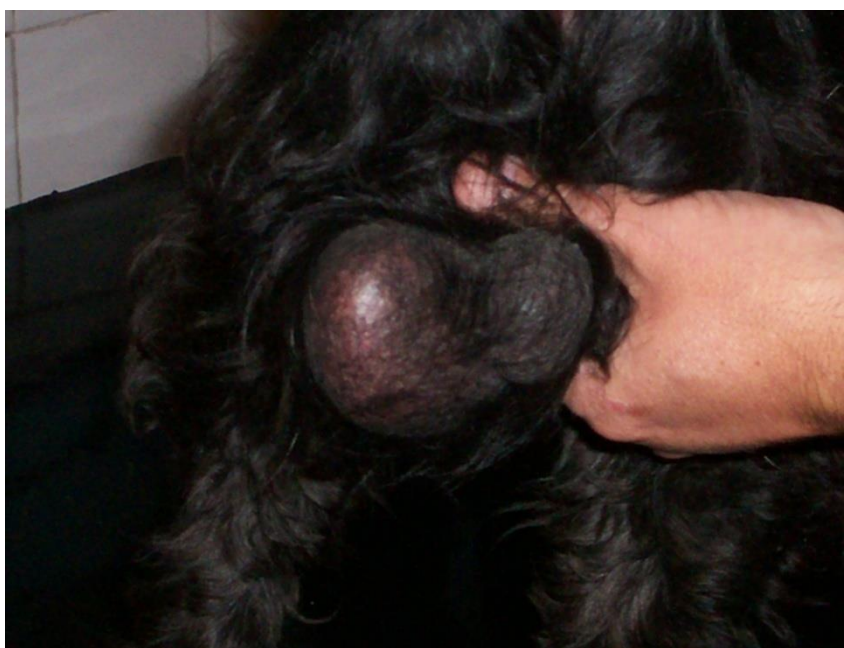


Foto 7: Orquiepididimitis unilateral.



Foto 8: Dermatitis escrotal y perineal.

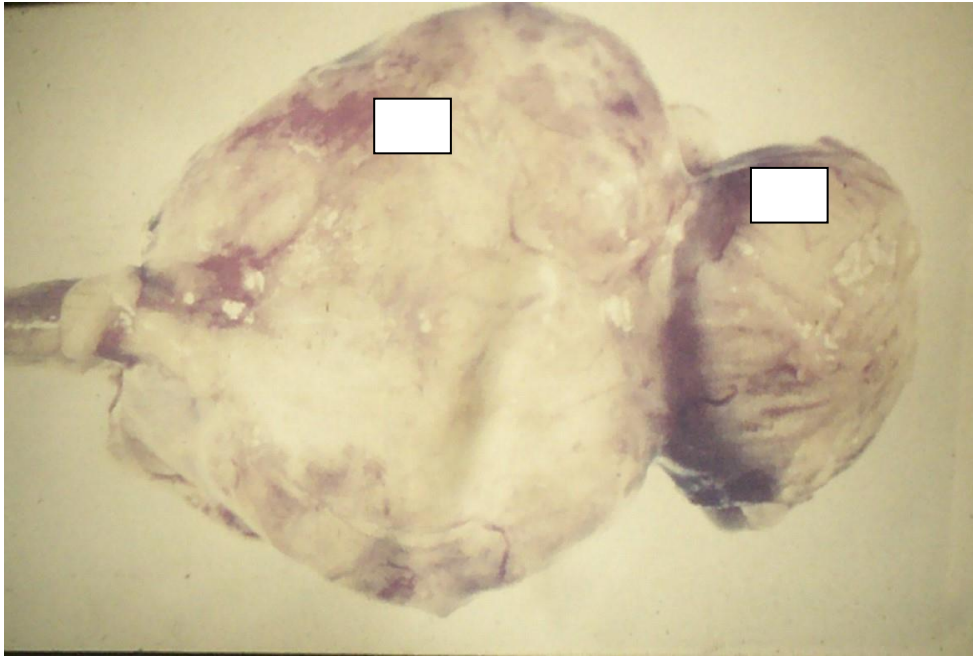


Foto 9: Hiperplasia Prostática Benigna. A próstata, B vejiga urinaria

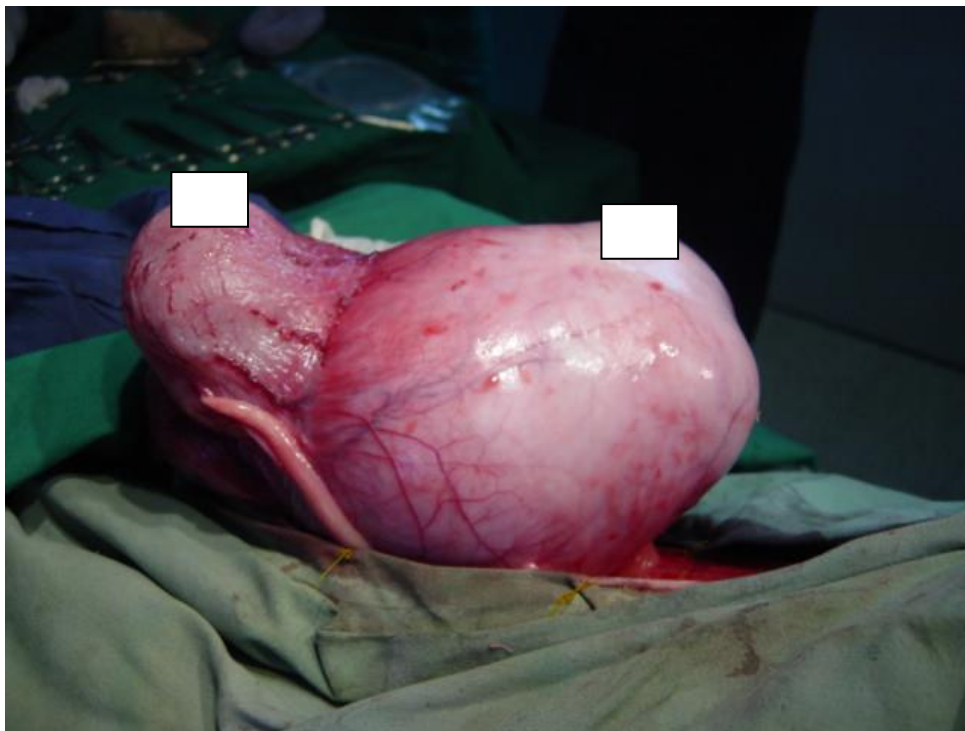


Foto 10:
Quiste

paraprostático. A quiste, B vejiga urinaria

CAPITULO 21

Enfermedades reproductivas de la hembra canina

Romina Gisele Praderio

La hembra canina, necesita encontrarse en óptimas condiciones de salud y gozar de bienestar animal para poder reproducirse (óptima condición corporal, exenta de factores estresantes y óptimo estado sanitario). En este capítulo trataremos las afecciones de los órganos reproductivos de la hembra canina, haciendo hincapié en las de mayor relevancia en la clínica reproductiva.

Desórdenes del Ovario

Síndrome de Ovario Remanente

Esta entidad se produce cuando restos de ovario han quedado en la bolsa ovárica luego de la cirugía o células ováricas se implantan en tejidos adyacentes. El tejido ovárico residual sigue funcional en el organismo, por lo que, luego de la castración quirúrgica, estos pacientes muestran signología de una hembra que cicla (Johnston y col., 2001; Feldman y Nelson, 2007; Sontas y col., 2007). Pueden tener signos externos de celo variables (edema vulvar leve,

moderada o importante, con o sin descarga vaginal), atraer al macho pero no aceptar la monta, ó a veces, aceptar el servicio.

El ovario derecho, por poseer una posición más craneal que el izquierdo, es el que se encuentra remanente con mayor asiduidad, ya que es anatómicamente el más difícil de abordar.

Así mismo, aunque infrecuente, se ha comunicado que esta entidad se ha dado en pacientes que presentaban un ovario accesorio, tejido ovárico ectópico (Johnston y col., 2001).

Signos clínicos

Las perras con síndrome de ovario remanente pueden mostrar signología de proestro-estro, tales como edema vulvar, secreción vulvar serosanguinolenta, atracción al macho, aceptación de la monta y pseudopreñez (Johnston y col., 2001; Feldman y Nelson, 2007).

Diagnóstico

Se aproxima el diagnóstico en base a la anamnesis (en la cual debemos confirmar que la perra no haya recibido administración exógena de estrógenos), examen físico, citología vaginal, mediciones de hormonas séricas. El diagnóstico definitivo se alcanza con la laparotomía exploratoria para localizar el ovario remanente, extraerlo y realizar el estudio histopatológico.

Tratamiento

Debe realizarse una laparotomía exploratoria durante el estro o diestro para remover el tejido ovárico remanente. Se recomienda que la misma sea realizada por un cirujano con experiencia y en las etapas del ciclo estral citadas ya que los folículos ováricos (estro) o cuerpos lúteos (diestro) facilitarán la visualización del tejido. El sitio en el que se encuentra frecuentemente es el ligamento ovárico (Johnston y col., 2001; Feldman y Nelson, 2007). Una vez removido, el tejido debe enviarse al laboratorio de histopatología para su estudio.

Quistes foliculares

Los quistes foliculares son estructuras ováricas que contienen un líquido seroso y se encuentran limitadas por una pared (Foto 1 y 2). Los mismos se desarrollan como

consecuencia de un folículo ovárico que no llega a ovular, sigue en crecimiento y produciendo estrógenos. Las altas concentraciones de estrógenos séricos, se asocian a la ocurrencia de estro persistente, con los signos clínicos asociados a la estrogenemia presente. Es así que, la presencia de quistes foliculares predispone al desarrollo de ciertas entidades como hiperplasia endometrial quística-piometra, anemia arregenerativa, coagulopatías, etc.

Los quistes pueden ser únicos o múltiples y estar presente en uno o ambos ovarios. Los quistes bilaterales son menos frecuentes que los unilaterales, estudios previos muestran una incidencia del 32 % de quistes ováricos bilaterales (Johnston y col., 2001; Fontbonne, 2011). En un estudio realizado por Dow se observó que la incidencia de los quistes foliculares fue mayor en hembras nulíparas en comparación con las múltiparas (Dow, 1960).

Se considera quiste folicular cuando el diámetro de la estructura es mayor a un folículo preovulatorio y perdura en el tiempo por más de 30 días (Johnston y col., 2001, Feldman y Nelson, 2007). Se observó que el diámetro de los quistes oscilaba entre 1 a 5 cm, siendo los de 5 cm los menos frecuentes y, presentes en ovarios con quistes múltiples. En ovarios con quistes únicos el diámetro varió de 1 a 1,5 cm (Dow, 1960; Feldman, 2007). En un estudio reciente se observó que la mayoría de los quistes poseían un tamaño menor o igual a 0,5 cm (Knauf y col., 2014).

Signos clínicos

Los signos clínicos de perras con quistes foliculares activos son similares a los manifestados durante proestro y estro (edema vulvar, descarga vaginal serosanguinolenta, entre otros) asociados a estro persistente. Así mismo la paciente puede presentar signos asociados a los efectos adversos de los estrógenos (HEQ-Piometra, hipoplasia o aplasia medular y sus consecuencias, dermatopatías estrogénicas) (Johnston y col., 2001; Knauf y col., 2014).

Diagnóstico

El diagnóstico se aproxima mediante la anamnesis, signos clínicos y citología vaginal en la que se observa un alto porcentaje de células superficiales (80 a 90 %). En la ecografía abdominal puede observarse una o más estructuras quísticas anecoicas en al menos uno de los ovarios.

Tratamiento

El tratamiento de elección es la ovariectomía. Sin embargo, en aquellas hembras con fines reproductivos, se puede realizar un tratamiento médico con hCG.

El objetivo de la terapia con gonadotropinas es inducir la ovulación y/o luteinizar los quistes foliculares. Para evaluar la efectividad del tratamiento pueden realizarse mediciones séricas de progesterona postratamiento. La misma debería ascender si el quiste se luteinizó (Feldman y Nelson, 2007). Es conveniente utilizar prostaglandinas para producir la luteólisis del quiste 30 días postratamiento para reducir los efectos de la progesterona sobre el útero.

Tumores Ováricos

Los tumores ováricos son de baja incidencia en la perra, y ocurren generalmente a edades avanzadas, excepto el teratoma, el cual se presenta a una edad promedio de 4 años.

En el ovario de la perra podemos encontrar tumores epiteliales, de cordones sexuales y de las células germinales. Entre los tumores de los cordones sexuales los de mayor ocurrencia son el tumor de células de la granulosa, mientras que de los tumores de células germinales los más comunes son los disgerminomas y teratomas (Nielsen y col., 1976; Feldman y Nelson, 2007; Rota y col., 2013).

Signos clínicos

Los signos pueden variar dependiendo del tipo de tumor. Algunos son productores de hormonas, como el tumor de células de la granulosa que produce estrógenos, por lo que la hembra puede demostrar signología estrogénica (proestro-estro persistente, dermatopatías, etc). Así mismo, puede conducir al desarrollo de HEQ-Piometra por lo que muchas veces es un hallazgo durante la OVH. Este tumor se presenta como una masa unilateral de tamaño variable, el cual oscila entre 0,4 y 10cm de diámetro. Con menor frecuencia se ha observado la presentación bilateral. Entre los signos clínicos podemos observar distensión abdominal y ascitis (Spoor y col., 2014). Además, por la acción estrogénica, las hembras pueden manifestar alteraciones hematopoyéticas. Los tumores de células germinales (teratoma y disgerminoma) pueden presentar distensión abdominal (Jergens y col., 1987). A diferencia de los tumores descritos previamente no se los ha asociado a ascitis. También pueden ser asintomáticos (Johnston y col., 2001; Feldman y Nelson, 2007).

Diagnóstico

El diagnóstico se aproxima mediante la anamnesis, signos clínicos, examen físico y realización de estudios complementarios de diagnóstico por imágenes. El mismo se confirma con la realización de una biopsia excisional y el estudio histopatológico del tumor. Durante el examen clínico podemos encontrar una masa palpable en la zona ovárica realizando la maniobra de palpación abdominal. Luego del hallazgo de la masa, debe indicarse una radiografía/ecografía para aproximarnos al diagnóstico, en las cuales podemos observar una masa caudal al riñón.

Tratamiento

Extirpación de la masa tumoral y el útero si el cuadro clínico lo requiere (Foto 3 y 4).

Desórdenes del útero canino

Complejo Hiperplasia endometrial quística-piómetra

El Complejo Hiperplasia Endometrial Quística- Piómetra es una afección hormonodependiente que afecta con más frecuencia a hembras sexualmente maduras, de edad media a avanzada (generalmente mayores a 6 años) y/o a hembras jóvenes que han sido tratadas con progestágenos con el fin de evitar ciclos estrales y preñeces no deseada.

La Hiperplasia Endometrial Quística (HEQ) es una entidad caracterizada por cambios en el endometrio relacionados principalmente con la acción de la progesterona (P4), pero también por la acción de los estrógenos sobre el útero lo que conduce al desarrollo de hiperplasia endometrial quística (HEQ) (Silva-Molano y Loaiza-Echeverri; 2007). Una vez instaurada la HEQ si ocurre invasión y multiplicación bacteriana desarrolla una piómetra. Esta es una de las afecciones reproductivas más importantes en la hembra canina, tanto por su prevalencia como por su morbilidad y mortandad. Constituye un problema que no solo compromete la capacidad reproductiva de la hembra sino que pone en riesgo su vida, llevando muchas veces al deceso de la paciente.

Etiotopatogenia

La P4 promueve el crecimiento y la secreción de las glándulas endometriales y a la vez suprime la actividad miometrial, por lo cual se acumula secreción glandular en el útero, lo que genera un ambiente propicio para la proliferación bacteriana (De Bosschere, 2001; Johnston y col., 2001; Feldman y Nelson, 2007). Los estrógenos (E2) estimulan la síntesis de receptores de P4 en las células endometriales, acrecentando de este modo la acción de P4 sobre el útero, y a la vez producen la apertura del cérvix, lo cual facilita el ascenso de las bacterias que forman parte de la flora vaginal al útero (Dow, 1959; Silva-Molano y Loaiza-Echeverri, 2007). Así mismo, los estrógenos promueven el aumento de la vascularidad en el endometrio y la llegada de polimorfonucleares al mismo (Johnston y col., 2001).

En respuesta al estímulo hormonal, el endometrio canino sufre un engrosamiento debido al proceso de hiperplasia e hipertrofia de las glándulas endometriales, las que comienzan a secretar y liberar su contenido. Conjuntamente ocurre edema en el estroma y, muchas veces, infiltrado de células de la inflamación. Este proceso lleva a la ocurrencia de hidrómetra o mucómetra (designación dependiente del grado de hidratación de la mucina) cuando el contenido es estéril, ó al desarrollo de una piómetra luego de una infección bacteriana. Esta última, es la consecuencia más frecuente de la HEQ. El diagnóstico de HEQ posee cierto grado de dificultad ya que las hembras no presentan signos clínicos a excepción de los reproductivos (subfertilidad o infertilidad). Sin embargo cuando la piómetra está instaurada el paciente presenta variados signos clínicos asociados a la enfermedad. Un diagnóstico rápido que permita instaurar un tratamiento efectivo y precoz aumenta la sobrevivencia del paciente.

El momento del ciclo estral en que se desarrolla la piómetra es la fase luteal, ya que en ella la P4 se encuentra aumentada por un período largo de tiempo (9 a 12 semanas luego de la ovulación), momento en el cual la concentración de esta hormona es muy alta, llegando a superar muchas veces valores de 40 ng/ml. En las hembras en anestro, la P4, se encuentra basal, siendo sus valores menores a 0,5 ng/ml. Durante el proestro, su concentración sigue siendo baja, P4: < 1 ng/ml, y comienza a aumentar nuevamente al inicio del estro, donde sus valores son mayores a 2 ng/ml (Feldman y Nelson, 2007). Estudios realizados por Heiene demostraron que las concentraciones plasmáticas de P4 de la fase luteal fueron similares en hembras con piómetra y en hembras sanas (Heiene y col., 2004).

Esta entidad se puede presentar a cuello abierto o a cuello cerrado, dependiendo de la etapa del ciclo estral en la que se manifiesta, ya que durante la fase lútea el cérvix se encuentra cerrado, por lo cual la secreción no va a ser visible; aunque también puede desarrollarse en la fase lútea pero manifestarse luego, cuando ya el diestro terminó y las concentraciones plasmáticas de P4 son basales, por lo cual se produce la apertura del cérvix y el contenido uterino se hace evidente. La piómetra a cuello cerrado es más grave, y muchas

veces se diagnostica tardíamente debido a que el propietario no observa la descarga vulvar y puede tardar en llevar a la perra a consulta. En la piómetra a cuello cerrado el contenido uterino puede ser de gran cuantía asociándose a ruptura del órgano con peritonitis subsecuente, lo que es mucho más grave para la paciente y de peor pronóstico.

La flora bacteriana que interviene en la infección uterina es comúnmente la aislada de la flora vaginal normal. Los microorganismos avanzan hacia el útero a través del cérvix en las etapas del ciclo estral en los que este se encuentra abierto. Así mismo, se han observado otras bacterias que podrían acceder al útero en forma descendente. Sin embargo, las bacterias de la flora vaginal son las consideradas la fuente de contaminación más factible (Feldman y Nelson, 2007).

En la perra sin cambios endometriales, las bacterias ascienden al útero en proestro y estro, ya que en estas etapas el cérvix se encuentra abierto, pero no se produce la infección, ya que el sistema inmune de la paciente controla y elimina la colonización; por lo cual se demuestra que el desarrollo de la entidad no solo está adjudicado a la contaminación bacteriana, sino que intervienen otros factores predisponentes relacionados con la administración exógena de estrógenos y/o progesterona, y la repetida exposición de altos niveles de progesterona en cada diestro lo cual predispone a HEQ.

La bacteria más frecuentemente aislada de los cultivos de hembras con piómetra es la *E. coli*, aunque también se han aislado otras como estafilococos, estreptococos, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Hemophilus*, *Pasteurella*, *Serratia*, entre otras. Los mismos microorganismos se han encontrado en la flora vaginal de hembras caninas sanas (Feldman y Nelson, 2007; Enginler y col., 2014).

La *E. coli* es una bacteria gramnegativa, que presenta una endotoxina en su membrana, químicamente estable y activa, la cual se libera cuando la bacteria muere, provocando de este modo una endotoxemia, ocurriendo signología clínica asociada (shock séptico) cuando los niveles séricos de la endotoxina exceden los 0,05 ng/ml (Feldman y Nelson, 2007).

Signos clínicos

Como se mencionó anteriormente la piómetra puede ser a cuello abierto o cerrado. La signología varía dependiendo de su presentación y evolución. Una hembra con piómetra a cuello abierto puede presentar una leve descarga vulvar, en ausencia de signos sistémicos, y a medida que avanza el cuadro acentuarse la signología, pudiéndose observar una secreción vulvar copiosa, la cual puede ser sanguinolenta (Foto 5) o mucopurulenta (Foto 6) y fácilmente detectable, sumado a signos sistémicos como letargia, depresión, anorexia, polidipsia, poliuria, vómitos y diarrea en cuadros avanzados (Johnston y col., 2001; Feldman y Nelson, 2007; Pretzer, 2008). En contraste, las hembras con piómetra a cuello cerrado no presentan secreción vulvar, sin embargo, generalmente manifiestan signos clínicos más severos al

momento de la consulta debido que la enfermedad es menos evidente para el propietario. Los signos clínicos sistémicos comprenden depresión, letargia, anorexia, polidipsia, poliuria, pérdida de peso, vómitos y diarrea, seguidos por signos de septicemia y toxemia (Johnston y col., 2001; Johnson, 2005), llevando a un estado de deshidratación severa conocido como síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), el mismo ocurre en 6 de cada 10 perras (Fransson y col., 2007). El deceso del animal ocurre si no se instaura un tratamiento rápido y eficaz en el momento adecuado.

Al examen físico podemos encontrar un paciente alerta y de actitud normal con una leve descarga vulvar en los casos de una piómetra a cuello abierto que recién inicia, o un paciente deprimido, con dolor a la palpación abdominal en casos de piómetra a cuello abierto más avanzada y algunas veces, distensión abdominal si la descarga vulvar no permite el completo vaciado uterino. A la palpación abdominal puede palparse el útero agrandado a través del abdomen. En los casos de piómetra a cuello cerrado puede observarse decaimiento, algunos pacientes manifiestan dolor a la palpación abdominal y en algunos casos (si hay puntos de necrosis uterina y/o peritonitis) abdomen en tabla, lo cual impide la palpación abdominal. La temperatura rectal se encuentra dentro de los parámetros normales, pudiendo estar elevada si ocurre bacteriemia o septicemia. Así mismo, el paciente puede estar hipotérmico si presenta shock séptico registrándose tiempo de llenado capilar aumentado, pulso débil y taquicardia (Johnston y col., 2001; Pretzer, 2008).

Diagnóstico

La anamnesis, los signos clínicos y los hallazgos al examen físico permiten arribar a un diagnóstico presuntivo, el hemograma mostrará una leucocitosis neutrofílica con desvío a la izquierda y presencia de neutrófilos tóxicos, hallazgos que permiten aproximar el diagnóstico. Estudios de bioquímica sérica (urea y creatinina) permitirán evaluar la funcionalidad renal del paciente la cual puede encontrarse comprometida. Finalmente se arriba al diagnóstico definitivo mediante un estudio ultrasonográfico. En caso de la HEQ sin colecta uterina se aproxima el diagnóstico mediante ultrasonografía (Bigliardi y col., 2004) arribándose a diagnóstico definitivo mediante biopsia uterina (Johnson, 2005).

La paciente llega a consulta en diestro o luego de haber recibido tratamiento estrogénico o progestágeno. Al examen físico, la descarga vaginal cuando está presente es de ayuda diagnóstica, al igual que cuando percibimos el aumento del tamaño uterino a la palpación abdominal. Sin embargo, debemos recurrir a los métodos complementarios de diagnóstico por imagen para confirmar nuestra sospecha. Tanto la radiografía como la ultrasonografía van a evidenciar un útero aumentado de tamaño, pero el método diagnóstico de elección es la ecografía, ya que permite diferenciar la HEQ-piómetra de otras causas de agrandamiento uterino, como por ejemplo preñez, que con la radiografía no se puede confirmar si el tejido fetal

todavía no está calcificado (Johnston y col., 2001). Debe tenerse en cuenta que la descarga uterina purulenta no es suficiente para descartar una preñez, ya que puede ocurrir infección en uno de los cuernos mientras el contralateral está gestando (Silva-Molano y Loaiza-Echeverri; 2007). Todo lo expuesto muestra la importancia de la ecografía en la aproximación diagnóstica.

En una paciente con piómetra la radiografía permite evidenciar una estructura tubular cuyo diámetro puede ser mayor tamaño que el de las asas intestinales, ubicada en abdomen caudoventral y que puede desplazar a los órganos abdominales. Así mismo, pueden observarse imágenes de peritonitis secundaria a una ruptura uterina. La ecografía permite determinar el tamaño del útero, espesor de la pared uterina, y la presencia de líquido dentro del lumen, además de descartar una preñez a partir el día 18-21 de la ovulación.

Tratamiento

La ovariectomía (OVH) es el tratamiento de elección para todas aquellas pacientes que no tienen un fin reproductivo, ya que al extraer el órgano afectado se evitan recidivas (Foto 7, 8 y 9). Está indicada la estabilización del paciente antes de realizar la OVH para obtener óptimos resultados. Es de suma importancia iniciar una terapia antibiótica y analgésica rápidamente sumada a la terapia de sostén. Una perra con piómetra requiere hospitalización y fluidoterapia endovenosa. El objetivo de la fluidoterapia es corregir el desequilibrio hidroelectrolítico, mantener una perfusión tisular adecuada y mejorar la función renal ya que hay que evitar o disminuir la azotemia, la cual está asociada con signos clínicos severos (Johnson, 2005; Verstegen y col., 2008). Debe implementarse una antibióticoterapia relacionada con los microorganismos que se encuentran habitualmente implicados en esta enfermedad antes, durante y después de la OVH. La antibióticoterapia continúa por vía oral durante 7 a 10 días luego de la OVH (Feldman y Nelson, 2007). El pronóstico va a depender del estado de salud de la paciente en el momento de la cirugía y del manejo posoperatorio.

Como se dijo anteriormente, debe considerarse el tratamiento quirúrgico como primer opción en todas las pacientes que no sean utilizadas como reproductoras, pero para aquellas hembras con un fin reproductivo existen tratamientos médicos opcionales que nos permiten tratar esta afección y a la vez mantener la condición reproductiva de la hembra canina. Estos tratamientos podrán aplicarse siempre y cuando la condición clínica de la paciente lo permita.

La terapia médica incluye prostaglandinas naturales (PGF_{2α}), prostaglandinas sintéticas (cloprostenol), antiprogestinas (aglepristone), agonistas dopaminérgicos (cabergolina, bromocriptina) y combinaciones de ellas. A continuación se describirán los mecanismos de acción, efectos, ventajas y desventajas de cada una.

PGF_{2α} y análogos sintéticos: La PGF_{2α} (prostaglandina natural) y sus análogos sintéticos producen contracción del miometrio lo cual permite la expulsión del exudado desde el útero y a la vez provoca una disminución en la concentración de progesterona (P4) circulante por dos

mecanismos de acción: 1) produce vasoconstricción local, reducción del flujo sanguíneo hacia el cuerpo lúteo y degeneración celular lo que conlleva la lisis del mismo; 2) se une a receptores específicos, interfiriendo con la esteroidogénesis y reduciendo la producción de P4. Por otra parte, su administración se asocia a relajación del cérvix. Estas acciones dependen de la dosis, ruta, frecuencia y momento del ciclo estral en el que se administran (Nelson y col., 1982; Feldman y Nelson, 2007).

Los efectos secundarios de PGF2 α son inquietud, ambulación, hipersalivación, jadeo, vómitos, dolor abdominal, taquicardia, fiebre, defecación y descarga uterina. La PGF2 α posee metabolismo pulmonar, por lo cual los efectos de la misma son transitorios y desaparecen dentro de la hora posadministración (Silva-Molano y Loaiza-Echeverri, 2007). Esta droga no debe ser administrada a pacientes con problemas cardiorespiratorios (Feldman y Nelson, 2007) ni tampoco en razas braquicéfalas ya que pueden provocar el deceso del animal.

El uso de prostaglandinas está indicado para el manejo de piómetra a cuello abierto utilizándose dosis ascendente, una vez al día. Además se debe instaurar la antibioticoterapia correspondiente desde el inicio del tratamiento hasta 14 días después de finalizado el mismo.

El cloprostenol es un análogo sintético de la PGF2 α que puede utilizarse con el mismo propósito que ésta. Las PG sintéticas ejercen un efecto mayor en el organismo que las PG de origen natural por lo cual se utilizan a dosis menores para disminuir los efectos colaterales (Feldman y Nelson, 2007), a la vez disminuyen las contracciones miométriales resultando en una lenta evacuación uterina (Verstegen y col., 2008). En la actualidad, las PG naturales no se encuentran disponibles en el mercado por lo que las PG sintéticas son las que se utilizan frecuentemente solas o en combinación con otras drogas descritas a continuación.

Agonistas dopaminérgicos: Los agonistas dopaminérgicos son utilizados por causar disminución de la prolactina circulante. La prolactina es la hormona luteotrófica más importante en la perra. Los agonistas dopaminérgicos como cabergolina o bromocriptina poseen actividad antiproláctínica por lo cual al disminuir el soporte luteo producen una disminución en la concentración plasmática de P4 si se administran a partir del día 25 posovulación, momento en el cual el cuerpo luteo deja de ser autónomo. Se han utilizado estas drogas en combinación con PG, tanto natural como sintética (England y col., 2007). Además, esta combinación mejora el tratamiento con PG ya que permite reducir la dosis de la misma, disminuyendo sus efectos adversos y haciendo el tratamiento más seguro.

Aglepristone: El aglepristone es un antagonista de los receptores de P4 que se utiliza con el fin de bloquear los mencionados receptores. Este fármaco es muy efectivo en el período inicial del diestro en el que el CL es refractario a la lisis, por lo cual el uso de prostaglandinas no está indicado. Hay protocolos que lo combinan con cloprostenol. El cloprostenol se incluye en el protocolo luego de la apertura del cervix, con el fin de sumar acción contráctil en el miometrio. El aglepristone, es una droga muy segura y efectiva y puede ser utilizada tanto en piómetra a cuello abierto como cerrado ya que produce la apertura del cérvix (Fieni, 2006; Verstegen y col., 2008).

Luego de un tratamiento médico siempre es posible la recurrencia de esta afección y se recomienda servir a la hembra en el ciclo siguiente al tratamiento y no dejar pasar los ciclos sin monta.

Endometritis o Metritis posparto

Es una enfermedad del posparto en la cual se produce inflamación del endometrio y miometrio a causa de una infección bacteriana y suele manifestarse luego de algunos factores predisponentes como falta de limpieza durante la ayuda del parto, distocia, retención placentaria y/o fetal, tejido uterino desvitalizado, entre otras (Kutzler, 2010).

A diferencia de la piometra, la endometritis posparto se desarrolla en el periodo posparto, donde las concentraciones de progesterona son bajas, siendo la causa determinante la contaminación bacteriana del útero en puerperio (Johnston y col., 2001).

Signos clínicos

Los signos clínicos de una paciente que cursa endometritis posparto son hipertermia y descarga vulvar marrón rojiza de olor fétido en el puerperio temprano (entre 1 y 7 días posparto). Otros signos acompañantes son depresión, anorexia, mala o nula atención de los cachorros y disminución o cese de la producción láctea (Johnston y col., 2001; Feldman y Nelson, 2007). En caso de metritis severa pueden aparecer deshidratación severa, septicemia y/o endotoxemia.

Diagnóstico

El diagnóstico se realiza mediante la anamnesis, signos clínicos, examen físico, métodos de diagnóstico por imágenes, citología vaginal, hemograma y bioquímica sérica.

Al examen clínico podemos encontrar una paciente normal con o sin dolor a la palpación abdominal y agrandamiento uterino y, en casos más severos signos de shock séptico. El hemograma puede demostrar leucocitosis neutrofílica con desvío a la izquierda, o en casos muy avanzados leucopenia. Los valores de la bioquímica sanguínea pueden verse alterados dependiendo del grado de deshidratación. En la citología vaginal suele observarse abundante cantidad de neutrófilos, acompañado de eritrocitos, mucus, detrito, bacterias, y algunas veces células endometriales (Feldman y Nelson, 2007).

Tratamiento

La terapéutica de endometritis posparto consiste principalmente en la antibióticoterapia correspondiente y en casos avanzados con deshidratación y signología de shock se debe realizar fluidoterapia endovenosa adecuada con las necesidades del animal para estabilizar al paciente. En algunos casos, luego de la estabilización hemodinámica, puede ser necesaria la cirugía para remoción de tejido fetal y/o placentario o tejido uterino desvitalizado (Johnston y col., 2001) y en los casos de hembras en los que no se desee un fin reproductivo la ovariectomía podría ser la mejor opción a fin de evitar posteriores preñeces (Kutzler, 2010).

Hidrómetra/Mucómetra/Hemómetra

Se denomina hidrómetra y mucómetra al acúmulo de fluido estéril en el útero (el término difiere por el grado de hidratación de la mucina, como se dijo anteriormente).

Al examen clínico podemos encontrar aumento de tamaño del útero a la palpación abdominal. Los métodos complementarios de diagnósticos como ecografía o radiografía permiten observar el agrandamiento uterino permitiendo la ultrasonografía descartar una preñez. Una citología y cultivo del líquido intrauterino permiten aproximar el diagnóstico (Johnston y col., 2001). Así mismo, en el útero puede haber colecta de sangre, definido como hemómetra. La misma, no es muy frecuente y se ha observado en perras luego de episodios de torsión uterina o en casos intoxicación con productos warfarínicos (Johnston y col., 2001).

En el caso de la hidrómetra o mucómetra el tratamiento de elección es la OVH en hembras que no se utilizan como reproductoras a fin de evitar posteriores problemas de salud así como preñeces no deseadas. En el caso de hembras reproductoras la terapéutica medicamentosa con prostaglandinas, antiprogestinas (aglepristone), agonistas dopaminérgicos y combinaciones de estas drogas pueden ser una alternativa. Para el caso de la hemómetra el tratamiento depende de la causa primaria, ya que si es por torsión uterina el tratamiento es inevitablemente quirúrgico mientras que si hay intoxicación con warfarínicos primero debe tratarse la misma y luego decidir si se conservará el útero o no.

Anormalidades congénitas

Se han detectado alteraciones en el desarrollo del útero o ausencia de desarrollo del mismo como por ejemplo, aplasia unilateral, fusión parcial y cuernos asimétricos en su longitud, pero

estas alteraciones no son frecuentes. La aplasia de ovario asociada, puede o no estar presente (Johnston y col., 2001).

Desórdenes de la vagina

Hiperplasia Vaginal

Etiopatogenia

Se produce a causa de una respuesta exagerada de la mucosa vaginal a los estrógenos. Como consecuencia de esta estimulación hormonal, se produce gran edema en la mucosa vaginal, lo que lleva a eversión de la mucosa vaginal (Foto 10). Se da generalmente en perras jóvenes, de talla grande y razas braquicéfalas (Post y col., 1991).

Signos clínicos

Los signos aparecen durante proestro o estro, sin embargo se han observado también en diestro. La perra llega a consulta por la preocupación del propietario al observar una masa protruida en la zona vulvar. En menor medida los signos son lamido de la zona genital, dificultad para una micción normal y dificultad para copular.

Diagnóstico

El diagnóstico se realiza mediante la inspección clínica al visualizar el tejido protruido en la vulva y examen citológico vaginal para evidenciar la acción estrogénica sobre el epitelio. Debe diferenciarse de tumores vaginales y pólipos.

Tratamiento

El tratamiento depende de la gravedad de los signos clínicos que presente la hembra. La mucosa evertida debe mantenerse limpia y humectada, lavándola 2 o 3 veces con agua fría, secándola con un paño absorbente y recubriéndola con vaselina líquida. Si ha ocurrido necrosis de parte de la mucosa vaginal la misma debe removerse quirúrgicamente. Cuando las concentraciones de estrógeno descienden disminuye el edema de la mucosa vaginal y el tejido

retorna a su tamaño normal, mientras tanto, debe mantenerse el tejido lubricado y en buenas condiciones de higiene. Para evitar recidivas, debe procederse a la ovariectomía, ya que en cada ciclo volverá a ocurrir el gran edema de la mucosa vaginal. En hembras reproductoras debe evaluarse la fertilidad ya que puede estar comprometida (Feldman y Nelson, 2007; Stornelli y col., 2009).

Vaginitis

Etiología

La vaginitis es un proceso inflamatorio de la vagina, relacionado con afecciones no solo genitales sino también urinarias. La misma puede presentarse en hembras de cualquier edad y raza, en cualquier etapa del ciclo reproductivo (Johnston y col., 2001; Johnson, 2005).

En hembras adultas, la vaginitis se encuentra asociada a infecciones bacterianas producidas generalmente por coliformes, estreptococos o estafilococos, o víricas como herpes virus (Johnston y col., 2001), irritación física o química, estimulación androgénica, neoplasias o anomalías anatómicas.

En las hembras prepúberes puede ocurrir vaginitis con cierta frecuencia, la cual remite al alcanzar la perra la pubertad. Esta entidad es llamada vaginitis juvenil o infantil.

Signos clínicos

Las perras con vaginitis presentan frecuentemente secreción vulvar mucosa, mucopurulenta o purulenta, pudiendo presentar lamido vulvar, dermatitis perivulvar, polaquiuria, tenesmo y atracción a los machos (Johnson, 2005; Feldman y Nelson, 2007; Purswell, 2007). El último signo se encuentra asociado a cualquier entidad que presente descarga vulvar.

Diagnóstico

Podemos arribar al diagnóstico mediante la anamnesis, signos clínicos y examen físico. La confirmación diagnóstica se realiza mediante citología vaginal y vaginoscopía (Johnson, 1991; Johnson, 2005; Feldman y Nelson, 2007). En la citología vaginal se observan células de la inflamación. Con la vaginoscopía podemos evaluar la inflamación de la mucosa, presencia de neoplasias y, anomalías anatómicas o presencia de cuerpos extraños que podrían haber sido la causa predisponente de vaginitis.

Tratamiento

En los casos de la vaginitis juvenil no está indicada la aplicación de antibióticos sistémicos o tópicos, combinados con baños en la zona perineal. La vaginitis infantil resuelve sin terapia médica. Los casos de vaginitis en perras adultas generalmente se asocian a una causa predisponente (ej: infección urinaria, neoplasia vaginal, etc) la cual debe ser eliminada para que resuelva la vaginitis. Es así que por ejemplo, la sola administración de antibióticos sin la remoción de la neoplasia no resolverá la vaginitis presente.

Neoplasias Vaginales

En la vagina podemos encontrar tumores benignos y malignos. Dentro de los tumores benignos se incluyen fibromas, leiomiomas (Foto 11), pólipos y lipomas; y dentro de los malignos leiomiosarcomas, mastocitomas y carcinomas de células transicionales (Feldman y Nelson, 2007). Estos tumores son infrecuentes en la perra, y se observan en pacientes gerontes.

El TVT (tumor venéreo transmisible) es un tumor frecuentemente encontrado en perras enteras, pos-púberes. También puede encontrarse este tumor en hembras castradas que presentan síndrome de ovario remanente.

Signos clínicos

La neoformación puede observarse protruyendo o no por vulva con o sin descarga vulvar acompañante y lamido de la zona vulvar. Dependiendo del compromiso de la masa puede observarse como signos asociados estranguria, tenesmo, disuria e incontinencia urinaria o fecal.

Diagnóstico

La aproximación diagnóstica se realiza mediante la anamnesis y signos clínicos. El diagnóstico se aproxima mediante un estudio citológico y se confirma mediante biopsia de la neoformación (Johnston y col., 2001; Feldman y Nelson, 2007).

Tratamiento

El tratamiento de elección es la remoción quirúrgica de la masa, aunque deben evaluarse la condición general del paciente, el compromiso de la zona afectada, la malignidad de la masa, entre otros, antes de optar por la resolución quirúrgica (Soderberg, 1986; Manothaiudom y Johnston, 1991; Johnston y col., 2001).

Bibliografía

- Bigliardi, E.; Parmigiani, E.; Cavirani, S.; Luppi, A.; Bonati, A.; Corradi, A. (2004). "Ultrasonography and Cystic Hyperplasia-Pyometra Complex in the Bitch". *Reprod Dom Anim* 39, pp. 136-140.
- De Bosschere, H.; Ducatelle, R.; Vermeirsch, H.; Van Den Broeck, W.; Coryn, M. (2001). "Cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in the bitch: Should the two entities be disconnected?". *Theriogenology* 55, pp. 1509-1519.
- Dow, C. (1959). "The cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch". *J Comp Path* 69, pp. 237-250.
- Dow, C. (1960). "Ovarian abnormalities in the bitch". *J Comp Path* 70, pp. 59-69.
- Enginler, S.O.; Ates, A.; Diren Sigirci, B.; Sontas, B.H.; Sonmez, K.; Karacam, E.; Ekici, H.; Evkuran Dal, G.; Gurel, A. (2014). "Measurement of C-reactive protein and Prostaglandin F2alfa Metabolite Concentrations in Differentiation of Canine Pyometra and Cystic Endometrial Hyperplasia/Mucometra". *Reprod Dom Anim* 49, pp. 641-647.
- England, G.C.; Freeman, S.L.; Russo, M. (2007). "Treatment of spontaneous pyometra in 22 bitches with a combination of cabergoline and cloprostenol". *Vet Rec* 160, pp. 293-6.
- Feldman, E.C.; Nelson, R.W. (2007). *Endocrinología y Reproducción canina y felina*. (3ra ed.). Buenos Aires, Argentina: Inter-Médica.
- Fieni, F. (2006). "Clinical evaluation of the use of aglepristone, with or without cloprostenol, to treat cystic endometrial hyperplasiapyometra complex in bitches". *Theriogenology* 66, pp. 1550-6.
- Fontbonne, A. (2011). "Infertility in bitches and queens: recent advances". *Rev Bras Reprod Anim* 35 (2), pp. 202-209.
- Fransson, B.A.; Lagerstedt, A.S.; Bergström, A.; Hagman, R.; Park, J.S.; Chew, B.P.; Evans, M.A.; Ragle, C.A. (2007). "C-reactive protein, tumor necrosis factor α , and interleukin-6 in dogs with pyometra and SIRS". *J Vet Emerg Crit Care* 17, pp. 373-81.
- Heiene, R.; Van Vonderen, I.K.; Moe, L.; Molmen, G.S.; Larsen, N.H.; Kooistra, H.S. (2004). "Vasopressin secretion in response to osmotic stimulation and effects of desmopressin on urinary concentrating capacity in dogs with pyometra". *AJVR* 65 (4), pp. 404-408.
- Jergens, A.E.; Knapp, D.W.; Shaw, D.P. (1987). "Ovarian teratoma in a bitch". *J Am Vet Med Assoc* 191 (1), pp. 81-3.
- Johnson, C.A. (1991). "Diagnosis and treatment of chronic vaginitis in the bitch". *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 21 (3), pp. 523-31.
- Johnson, C.A. (2005). "Enfermedades Reproductivas". En: Nelson, R.W., Couto, C.G. *Medicina Interna de Animales Pequeños*. (3ra ed.). Buenos Aires, Argentina: Inter-Médica.
- Johnston, S.D.; Root Kustritz, M.V.; Olson, P.N.S. (2001). *Canine and feline theriogenology*. (1st ed.). Philadelphia: W.B. Saunders Company.

- Knauf, Y.; Bostedt, H.; Failing, K.; Knauf, S.; Wehrend, A. (2014). "Gross Pathology and Endocrinology of Ovarian Cysts in Bitches". *Reprod Dom Anim* 49, pp. 463-468.
- Kutzler, M.A. (2010). Alteraciones del posparto en perros. *En: Kirk Terapéutica Veterinaria Actual XIV*. pp.999-1002. (14ed). España: Elsevier.
- Manothaiudom, K.; Johnston, S.D. (1991). "Clinical approach to vaginal/vestibular masses in the bitch". *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 21(3), pp. 509-21.
- Nelson, R.W.; Feldman, E.C.; Stabenfeldt, G.H. (1982). "Treatment of canine pyometra and endometritis with prostaglandin F2 alpha". *J Am Vet Med Assoc* 181 (9), pp. 899-903.
- Nielsen, S.W.; Misdorp, W.; McEntee K. (1976). "Tumours of the ovary". *Bull World Health Organ* 53, pp. 203-215.
- Post, K.; Van Haaften, B.; Okkens, A.C. (1991). "Vaginal hyperplasia in the bitch: Literature review and commentary". *Can Vet J* 32, pp. 35-37.
- Pretzer, S.D. (2008). "Clinical presentation of canine pyometra and mucometra: A review". *Theriogenology* 70, pp. 359-363.
- Purswell, B.J. (2007). "Trastornos vaginales". *En Ettinger S.J. y Feldman E.C. Tratado de Medicina Interna Veterinaria. Enfermedades del perro y el gato*. pp. 1686-1690. (6ta ed.). Madrid, España: Elsevier.
- Rota, A.; Tursi, M.; Zabarino, S.; Appino, S. (2013). "Monophasic Teratoma of the Ovarian Remnant in a Bitch". *Reprod Dom Anim* 48, pp. 26-28.
- Silva-Molano, R.F.; Loaiza-Echeverri, A.M. (2007). "Piómetra en animales pequeños". *Vet Zootec* 1 (2), pp. 71-86.
- Soderberg, S.F. (1986) "Vaginal disorders". *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 16 (3), pp. 543-59.
- Sontas, B.H.; Gurbulak, K.; Ekici, H. (2007). "Ovarian remnant syndrome in the bitch: a literature review". *Arch Med Vet* 39 (2), pp. 99-104.
- Spoor, M.S.; Flesner, B.K.; Trzil, J.E.; Whitney, M.S.; Shaw, D.P.; Selting, K.A. (2014). "What is your diagnosis? Intra-abdominal mass in a female spayed dog". *Vet Clin Pathol* 43 (1), pp. 109-110.
- Stornelli, M.A.; Stornelli, M.C.; García Mitacek, M.C.; Savignone, C.A.; Nuñez Favre, R.; Bonaura, M.C.; Tittarelli, C.M. (2009). "Cambios uterinos asociados a hiperplasia vaginal en perras". *X Jornadas de Divulgación Técnico Científicas*. (pp. 229-230). Facultad de Ciencias Veterinarias–Universidad Nacional de Rosario.
- Verstegen, J.; Dhaliwal, G.; Verstegen-Onclin, K. (2008). "Mucometra, cystic endometrial hyperplasia, and pyometra in the bitch: Advances in treatment and assessment of future reproductive success". *Theriogenology* 70, pp. 364-374.



Foto 1: Quiste folicular en una perra con síndrome de ovario remanente.



Foto 2: Quiste folicular extirpado.



Foto 3: Tumor ovárico en perra visto a través de la bolsa ovárica.



Foto 4: Tumor ovárico en perra, sin bolsa ovárica.



Foto 5: Descarga vulvar sanguinolenta.

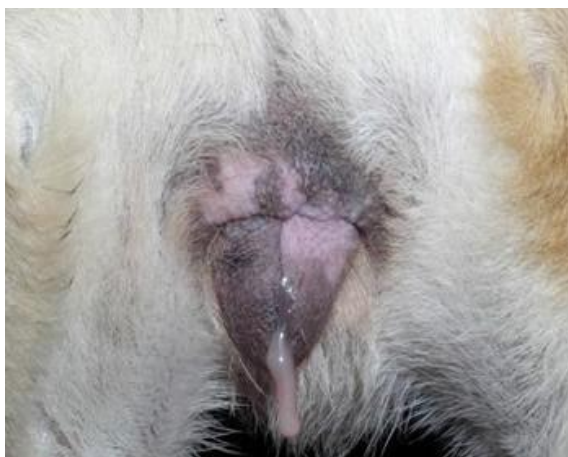


Foto 6: Descarga vulvar mucopurulenta.



Foto 7: Útero de perra con piómetra.

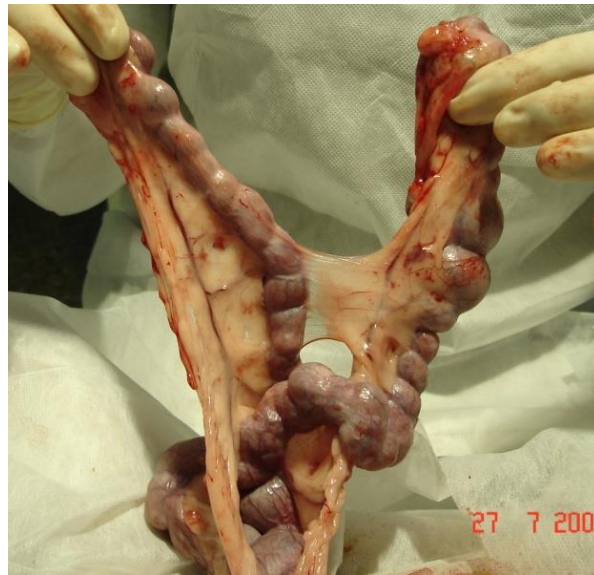


Foto 8: Útero de perra con piómetra.



Foto 9: Útero de perra con piometra.



Foto 10: Hiperplasia vaginal canina.



Foto 11: Leiomioma vaginal en perra.

CAPÍTULO 22

Tumores mamarios en hembras caninas

María Cecilia Stornelli

Introducción

Los tumores mamarios se encuentran entre los tumores de aparición más frecuente en el perro, y representan entre el 25 y el 50% de todas las neoplasias que ocurren en esta especie, siendo el segundo tumor más frecuente en perras, después de los tumores de piel. La edad promedio de aparición es de entre 6 y 10 años. Muchas de las perras afectadas, están enteras o se les realizó la ovariectomía siendo adultas (Nelson y Couto, 2000). En la perra, la mitad de los tumores mamarios son malignos, por lo cual probablemente habrá recidivas luego de la cirugía y metástasis en ganglios linfáticos y órganos distantes como pulmones e hígado (Changwei 2007).

Por otra parte, en los gatos, los tumores mamarios son de presentación menos frecuentes que en caninos y representan el 10% de todos los tumores no linfoides, con una edad promedio de aparición de 10 años (McEntee, 2002). Las neoplasias mamarias son raras en machos y animales jóvenes de ambos sexos (Nelson y Couto, 2000).

Los tumores mamarios caninos pueden ser clasificados utilizando el esquema de la Organización Mundial de la Salud: 1) Tumores derivados del tejido epitelial (ej Carcinomas); 2)

Tumores derivados del tejido conectivo (ej sarcomas); 3) Tumores mamarios mixtos, 4) Tumores Benignos, 5) Tumores no clasificados, 6) Displasias.

La neoplasia glandular más frecuente en la perra es el fibroadenoma (Novosad, 2003), con respecto a los tumores mamarios malignos observados en perras el más frecuente es el adenocarcinoma (37 a 85%) y el segundo en frecuencia de aparición es el tumor maligno mixto (7%). Solo el 3% son sarcomas y el 1% carcinomas inflamatorios (Chun y col., 2007). Las perras suelen presentar de manera concomitante, múltiples tumores mamarios histológicamente diferentes (Johnston y col., 2001). El término carcinoma inflamatorio se utiliza para describir un carcinoma muy poco diferenciado, con obstrucción linfática lo cual redundo en eritema y edema de las glándulas afectadas. Este tipo de tumor se asocia con un alto grado de metástasis (Novosad, 2003).

Es bien conocido que del mismo modo que ocurre en pacientes humanos, las hormonas ováricas juegan un rol central en el desarrollo de este tipo de tumores en perras. La implicancia de estas hormonas queda demostrada en animales, con el efecto protector que produce la ovariectomía. Es así que, las perras no ovariectomizadas presentan cuatro veces más riesgo de padecer tumores mamarios que las ovariectomizadas.

Cuando se comparó hembras enteras con hembras ovariectomizadas, pudo observarse que en las perras castradas antes del primer celo, el riesgo de padecer tumores mamarios fue del 0,5 % en comparación con las enteras. En aquellas perras ovariectomizadas después del primer celo fue del 8% y en aquellas castradas después del segundo celo fue del 26% (Johnston y col., 2001). Así mismo el efecto protector de la esterilización fue casi nulo si la perra pasó más de dos ciclos estrales (Chun y col., 2007; Misdorp, 1988).

Patogenia de los tumores mamarios

En las células mamarias la transformación neoplásica ocurre con la presencia de un promotor que estimula el crecimiento anormal, y las hormonas esteroideas pueden actuar como iniciadores o promotores. Esto explicaría la elevada incidencia de neoplasias mamarias en perras enteras al compararlas con perras ovariectomizadas. Los progestágenos estimulan la producción local de hormona del crecimiento la cual induce la formación de factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF) y proteína fijadora de IGF, creándose un ambiente de proliferación donde puede incrementarse el riesgo de transformación maligna. Estudios epidemiológicos realizados en humanos sugieren que si se logra reducir las concentraciones séricas de IGF1, se podría disminuir la proliferación de células cancerígenas (Queiroga y col., 2010). Los estrógenos pueden tener un efecto similar ya que es conocido su efecto mitogénico sobre el epitelio mamario (Johnston y col., 2001). Tanto en el tejido mamario normal como en masas tumorales han sido identificados receptores para estrógeno, progesterona, factor de

crecimiento epidermal y prolactina (Ruttman y col., 1993; Donnay y col., 1993). En los tumores malignos, el número de receptores fue menor, y su número fue disminuyendo a medida que las masas fueron menos diferenciadas y esto puede ser debido a la pérdida de genes en tejidos mamarios muy anaplásicos (Ruttman y col., 1993). Es así que han sido identificados receptores estrogénicos en el 40-60% de los tumores mamarios malignos y en el 70% de los benignos. Los receptores van disminuyendo a medida que disminuye la diferenciación celular. En los tumores malignos también han sido identificados receptores para prolactina (Mainenti y col., 2014; McEwen y col., 1982).

Es bien sabido que la progesterona y los progestágenos sintéticos (clormadinona, medroxiprogesterona), inducen el desarrollo lóbulo alveolar de la glándula mamaria con hiperplasia de los componentes secretorios y mioepiteliales, mientras que estradiol estimula el crecimiento ductal.

Quiroga y col comunicaron altas concentraciones séricas de (hormona del crecimiento) GH en perras con tumores mamarios tanto benignos como malignos, siendo las concentraciones más elevadas en aquellas perras que presentaban tumores malignos. El mecanismo por el cual GH ejerce su acción en la génesis de tumores mamarios no se conoce completamente, aunque se cree que es capaz de inducir la proliferación y diferenciación de células tumorales (Queiroga y col., 2010).

Por otra parte se ha comunicado que la condición corporal y la dieta pueden contribuir a la ocurrencia de tumores mamarios, se ha observado mayor incidencia de tumores mamarios en perras obesas así como en aquella que comen dietas no comerciales ricas en carnes rojas y cerdo (Perez y col.; 1998, Sonnenschein y col.; 1991).

Incidencia

Las neoplasias mamarias son raras en animales de menos de 5 años, si bien han sido diagnosticadas en perras jóvenes de entre dos y tres años de edad. La edad promedio en la que se realiza el mayor número de diagnósticos de neoplasias mamarias es de 10 años, con un rango de entre 8,8 y 11,2 años. La predisposición racial para el desarrollo de tumores mamarios no ha sido bien definida (Johnston y col., 2001), si bien algunos autores han comunicado una mayor frecuencia de aparición en algunas razas (setter inglés, fox terrier, bretón, cocker inglés, cocker spaniel, Boston terrier), (Chun y col., 2007, Johnston y col 2001).

Hallazgos clínicos

El hallazgo más común en perras con neoplasias mamarias es, la presencia de una o más masas visibles o palpables en una o más glándulas mamarias. Gran cantidad de las perras afectadas poseen varios nódulos en más de una glándula (Foto 2, 4). Varios autores comunicaron que entre el 52 al 64% de los tumores aparecen en la cuarta y quinta glándula mamaria. (Chun y col., 2007, Karayannopoulou y col.; 1990).

Las lesiones benignas tienden a ser pequeñas bien circunscriptas y firmes a la palpación, su crecimiento es lento y se mueven libremente bajo la piel, siendo las mamas caudales las que se afectan más habitualmente (Foto 2). Las perras con tumores benignos suelen ser asintomáticas y los únicos signos se asocian al discomfort relacionado con el crecimiento de la masa.

Por otra parte, los tumores mamarios malignos son de rápido crecimiento, adheridos a la piel y tejidos subyacentes, pueden estar inflamados y suelen ulcerarse (Foto 3 y 5).

Los sitios de metástasis más comunes incluyen pulmones y ganglios linfáticos regionales (Johnston, 2001; Peres y col.; 1998), también se ha comunicado la ocurrencia de metástasis en: riñones, hígado, huesos, piel, bazo (Brodey y col., 1983). En estos casos, los signos se relacionan con el sitio de metástasis.

Diagnóstico

Dentro de la evaluación diagnóstica se incluye el examen físico, así como la citología de la masa ya que si bien en muchas ocasiones no se puede diferenciar entre tumores benignos y malignos, sí es de utilidad para excluir otros diagnósticos diferenciales.(Chun y col., 2007). Dentro de los mismos podemos mencionar otras neoplasias (mastocitomas), mastitis e hiperplasia lobular.

Es importante la realización de radiografías torácicas para evaluar metástasis pulmonares y linfadenopatía esternal, así como la evaluación de los ganglios inguinales, sublumbar, mesentéricos y pélvicos, para de esta manera poder estadificar al tumor.

Las biopsias por escisión de las masas mamarias permitirán arribar al diagnóstico definitivo.

Pronóstico

Los factores de mal pronóstico incluyen: las características histológicas (los tumores poco diferenciados como sarcomas y carcinomas inflamatorios, son los de peor pronóstico), la evidencia histológica de invasión vascular o linfática, presencia de receptores para estrógeno y progesterona, tamaño tumoral superior a 3cm, afección de ganglios linfáticos, ulceración y metástasis (Novosad y col., 2003).

Tratamiento

Remoción quirúrgica

La remoción quirúrgica es la metodología terapéutica más aceptada, y han sido descritos varios procedimientos desde la escisión local hasta la mastectomía radical. En perras el plan quirúrgico más aceptado es la remoción de todo el tejido afectado con márgenes quirúrgicos amplios (Novosad y col., 2003). Sin embargo, un ejemplo en el que la cirugía está contraindicada es el carcinoma inflamatorio, ya que es imposible realizar la escisión completa del tumor y las recidivas ocurren rápidamente (Foto 1).

Las tumorectomías solo están indicadas en los nódulos mamarios pequeños (menores a 1cm de diámetro). Se considera que la mayoría de los tumores mamarios caninos (75%), pueden ser curados con cirugía como único tratamiento (Chun y col., 2007). La mayoría de los autores coinciden en que la realización de OVH en el mismo momento quirúrgico que la mastectomía no afecta el tiempo de supervivencia o el comportamiento biológico del tumor.

Quimioterapia

En perras, se considera a doxorubicina como uno de los agentes con mayor eficacia en el tratamiento de pacientes con enfermedad avanzada, utilizándose como coadyuvante de la cirugía (Novosad y col 2003). Los regímenes descritos incluyen doxorubicina (30 mg/m² iv cada tres semanas, al menos dos tratamientos), y una combinación de ciclofosfamida (1mg/kg vía oral una vez al día), vincristina (0,0125 mg/kg vía oral, una vez al día) y metotrexato (0,3 a 0,5 mg/kg iv una vez por semana).

Tamoxifeno ha sido usado como agente hormonal para bloquear los receptores estrogénicos a dosis de 0,5-1 mg/kg vía oral, una vez al día (Chun y col., 2007; Novosad, 2003).

Bibliografía

- Brodey, R S.; Goldschmidt M H.; Roszel J R. (1983). "Canine mammary gland neoplasm". *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 19, 61-90.
- Chun, R.; Garret, L. (2007) "Tumores génitourinarios y de glándulas mamarias". "En" Ettinger, S J.; Feldman, E C. *Tratado de medicina interna veterinaria*. (784-789). España: ELSEVIER.
- Donnay, I.; Rauis, J.; Woutes-Bellman, P. (1993). "Receptors for oestrogen, progesterone and epidermal growth factor in normal and tumorous canine mammary tissues". *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 47, 501-512.
- Johnston, S D.; Kuztritz, M V R.; Olson, P. (2001). "Disorders of the mammary glands of the bitch". "In": Ed. Johnston, S D.; Kuztritz, M V R.; Olson, P. *Canine and feline Theriogenology*, (pp. 262-264). Philadelphia: WB Saunders.
- Karayannopoulou, M.; Kaldrimidou E.; Dessiris, A. (1990). "Some epidemiological aspects of canine mammary tumors, treatment and prognosis". *Eur. J. Small. Anim. Pract.* 1, 41-47.
- Mac Ewen, E.G.; Patnaik, A K.; Harvey, H.J.; Panko, W.B.; (1982). "Estrogen receptors in canine mammary tumors". *Cancer Research* 42, 2255–2259.
- Mac Ewen, E.G. (2002). "Reproductive Oncology". *Clinical Techniques in Small Animal Practice*. 17 (3), pp. 133-149.
- Mainenti, M.; Rasotto, R.; Carnier, P., Zappulli, V. (2014). "Oestrogen and progesterone receptor expression in subtypes of canine mammary tumours in intact and ovariectomised dogs". *The Veterinary Journal*, 202, 62–68.
- Misdorp, W. (1988). "Canine mammary tumors: protective effect of late ovariectomy and stimulating effects of progestin". *Vet, Q* 10, 26-33.
- Novosad, C A. (2003). "Principles of treatment for Mammary gland tumors". *Clinical Techniques in small animal practice* 18 (2). Pp. 107-109.
- Nelson, R W.; Couto, C G. (2000). "Enfermedades de la glándula mamaria". "En" Nelson, R W.; Couto, C G. *Medicina Interna de Animales Pequeños*. Buenos Aires: Intermédica, pp. 931-935.
- Perez, A D.; Rutteman, G R.; Pena, L. (1998). "Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case control study". *J. Vet. Intern. Med.* 12, 132-139.
- Queiroga, F L.; Pérez-Alenza, D.; Silvan G.; Peña L.; Lopes, C S.; Illera J C. (2010). "Serum and intratumoural GH and IGF-I concentrations: Prognostic factors in the outcome of canine mammary cancer". *Research in Veterinary Science* 89, 396–403.
- Qiu, CH.; Lin, D.; Wang, J.; Wang, L. (2008). Expression and significance of PTEN in canine mammary gland tumors. *Research in Veterinary Science*, 85, 383–388.
- Rutteman, G R.; Misdorp, W. (1993). "Hormonal background of canine and feline mammary tumours". *J. Reprod. Fertil.* 47, 483-487.
- Sonnenschein, E G.; Glikman L T.; Goldschmidt, M H. (1991). "Body conformation, diet, and risk of breast cancer in pet dogs: A case- control study". *Am. J. Epidemiol.* 133, 694-703.



Foto 1: Carcinoma inflamatorio en perra raza Dogo



Foto 2: neoplasia mamaria en glándulas mamarias inguinal y abdominal caudal.



Foto 3: Neoplasia mamaria ulcerada en glándula mamaria abdominal caudal



Foto 4: Neoformaciones mamarias en glándulas inguinales



Foto 5: Neoformación mamaria con grado avanzado de ulceración

CAPÍTULO 23

Afecciones mamarias en hembras felinas

María Alejandra Stornelli

Características morfofisiológicas de las glándulas mamarias

En la gata domestica se identifican 4 pares de glándulas

- Par torácico craneal
- Par torácico caudal
- Par abdominal
- Par inguinal

Ocasionalmente puede existir otro par de mamas abdominales existiendo entonces el para abdominal craneal y el abdominal caudal. Las glándulas mamarias en la hembra joven no se distinguen del tejido adyacente excepto por el pezón. Poseen de 4 a 8 glándulas tubuloalveolares compuestas, cuyos conductos excretores (galactóforos) se abren en la punta del pezón uno al lado del otro. Ocasionalmente pueden fusionarse y desembocar varios en conjunto.

Las glándulas mamarias del animal en la época prepuberal, solo poseen conductos galactóforos y sus primeras ramificaciones. Cuando el animal llega a la pubertad, bajo la

influencia de los estrógenos ováricos y de la prolactina hipofisaria las glándulas comienzan a desarrollarse. Los vasos sanguíneos de las glándulas mamarias acompañan a los conductos excretores. El drenaje venoso es realizado por medio de los vasos axilares e intercostales, para los dos primeros pares de mamas y por los vasos epigástricos para los pares posteriores. Pequeñas venas que drenan a las glándulas mamarias pueden entrecruzarse en la línea media. Los capilares linfáticos nacen en el tejido conectivo intralobulillar y drenan en conductos linfáticos principales. Las mamas torácicas craneal y caudal drenan a los ganglios axilares y las mamas abdominales e inguinales drenan a los ganglios inguinales superficiales. A diferencia del drenaje venoso, no es frecuente observar entrecruzamientos.

Fibroadenomatosis mamaria

La fibroadenomatosis mamaria es también denominada hipertrofia o hiperplasia fibroepitelial mamaria. Fue descrita por primera vez en 1973 y posteriormente fue asociada al uso de progestágenos tanto en hembras como en machos (Mol y col 1990, Mol y col 1996, Jhonston 2001). La fibroadenomatosis se presenta en hembras jóvenes enteras, preñadas o con pseudopreñez en relación a la acción de la progesterona luteal. También se presenta en hembras o machos a los cuales se les administra progestágenos. Esta afección se caracteriza por el aumento rápido y difuso de las glándulas mamarias que remite rápidamente luego de la luteolisis pero tarda más en resolver luego de la interrupción de la administración de progestágenos. Los cambios histológicos asociados a esta afección son hiperplasia fibroepitelial así como hiperplasia y ectasia ductal. La mayoría de los pacientes no presenta necrosis ni inflamación salvo en la superficie epitelial, aunque en algunos casos puede ocurrir ulceración extensa. El examen clínico permite arribar a diagnóstico presuntivo, el cual se confirma mediante biopsia (Jhonston 2001). El cese del estímulo de progesterona o progestágenos sobre las mamas permite la remisión del cuadro. Es así que la luteolisis, ovariectomía, cese de administración de progestágenos y uso de antiprogestágenos se utilizan como tratamiento según sea el caso. Solo en algunos casos graves es necesario la remoción quirúrgica de la/s mamas (Mol y col 1990, Mol y col 1996).

Tumores mamarios

Características generales de las neoplasias mamarias felinas

En relación a la frecuencia de aparición, los tumores mamarios en las gatas ocupan el primer lugar luego de las neoplasias de piel y de tejido linfático. Sin embargo su incidencia es menor a la comunicada en humanos y caninos en los cuales alcanza el 50% de todos los tumores. Se ha comunicado que estos tumores representan el 14% de todos los tumores y el 76% de los tumores del aparato genital de la gata. Los tumores mamarios son muy poco frecuentes en el macho y representan menos del 2% de todos los tumores (Hayes y col 1981, Jhonston 2001, Stornelli y col 2004, Stornelli y col 2005, Morris y col 2013). Las hembras intactas poseen mayor riesgo de padecer cáncer mamario si se las compara con hembras ovariectomizadas antes del primer año de edad. Sin bien la castración temprana no elimina completamente el riesgo de padecer tumores mamarios, la castración antes del primer celo reduce significativamente su incidencia (Overley y col 2005; Kustritz, 2007). No se ha encontrado evidencia de asociación entre parto y riesgo de desarrollar tumores mamarios. Se han comunicado neoplasias mamarias en gatas de 9 meses a 23 años, la incidencia aumenta significativamente luego de los 6 años de edad, con un pico entre los 10 y 11 años, para declinar mas tarde(Jhonston 2001, Bonnet y col 2005, Ettinger 2006). Algunos autores sugieren que los gatos domésticos de pelo corto y los siameses poseen una incidencia mayor que otras razas. Se ha comunicado que las gatas siamesas presentan el doble de riesgo de padecer tumores mamarios y que los tumores aparecen a edad más temprana en comparación con otras razas (Jhonston 2001, Skorupski y col 2005).

Los tumores mamarios felinos son usualmente malignos y de comportamiento muy agresivo, con alta probabilidad recidivas y de metástasis. Aproximadamente el 80% de las neoplasias mamarias felinas presentan signos de malignidad, desarrollando frecuentemente una conducta altamente agresiva (Jhonston 2001, Hughes y col. 2012, Morris 2013). La expresión reducida de claudinas 2 ha sido asociada con la presencia de carcinoma y enfermedad metastásica (Flores y col. 2014)

En el citoplasma de las células tumorales se han encontrado bajo niveles de receptores de progesterona, no se han detectado receptores para dihidrotestosterona y solo el 10% de los tumores estudiados presentaron receptores para estrógenos (Jhonston 2001, Ortega García y col. 2013). En comparación con los tumores mamarios humanos, un bajo porcentaje de los tumores mamarios felinos posee receptores estrogénicos (Hughes y col. 2012). Esto refleja el mayor porcentaje de tumores malignos observados en felinos, ya que el índice de las células que se tiñen de forma positiva a receptores esteroideos decrece con el incremento de la malignidad (de la Mulas y col. 2000). Hace algunos años se ha observado la presencia de receptores anti-HER2 y anti-citoqueratinas basales (CK5/6 y CK14). El HER2 es un protooncogen que codifica un receptor tirosin-quinasa, una glicoproteína de estructura similar al receptor del factor de crecimiento epidérmico (proteína HER2) que se encuentra presente diferentes tumores. El HER2 se expresa en adenocarcinomas ováricos, gastrointestinales, mamarios y en el carcinomas de células transicionales de vías urinarias (Kim y col. 2006, Cheang y col. 2008). En la gata la sobreexpresión de HER2 en los tumores mamarios varía

entre del 36% al 90% (De María y col. 2005, Milanta y col. 2005, Winston y col. 2005, De María y col 2005) siendo la expresión en los adeniocarcinomas el 40% (Ordas y col. 2007). El carcinoma de mama en la gata con sobreexpresión de HER2 tiene características indicativas de gran malignidad (gran tamaño, grado histológico alto y ausencia de receptores hormonales, Ordas y col. 2007, Rutterman y col. 2001).

Conducta tumoral

Los tumores mamarios malignos son frecuentes en felinos, entre el 80% y el 90% de los tumores mamarios felinos son malignos (Milanta y col. 2002). En general estas neoplasias son grandes, invasivas, adheridas a la piel, ulceradas y con compromiso linfático. En un estudio realizado en 129 gatas que padecían tumores mamarios malignos pudo observarse que en el 83,6% ocurrían metástasis pulmonares, en el 82,8% metástasis de ganglios linfáticos regionales y el 23,6% metástasis hepática (Tomlinson y col. 1984). Las metástasis pueden ocurrir también en bazo, páncreas, glándulas adrenales, riñones, ovarios, pericardio, corazón, cerebro y huesos. Pueden coexistir en un mismo animal tumores mamarios de diferente tipo histológico. Sin embargo aproximadamente el 80% se clasifican como adenocarcinoma, siendo la mayoría de estos del tipo tubular, papilar y solido (Hayden y col. 1971).

Etiología

Las hormonas reproductivas se han relacionado con la ocurrencia de estos tumores desde hace mucho tiempo. La castración temprana disminuye significativamente el riesgo de padecerlos (Overley y col. 2005). Muchos trabajos documentan la presencia de adenocarcinoma tanto en hembras castradas como en hembras intactas tratadas con progestágenos. Se ha sugerido que ocurre un aumento del riesgo de padecer neoplasias mamarias con el uso de progestágenos en las gatas (McAloose y col. 2007). Un estudio realizado en hembras que recibieron tratamientos prolongados con acetato de medroxiprogesterona depot o con proligestone encontró un aumento de las concentraciones plasmáticas de hormona de crecimiento (GH), factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF) e IGF ligado a proteínas junto al desarrollo de tumores mamarios felinos (Mol y col. 1996).

Se han identificado tanto receptores estrogénicos como para progesterona en neoplasias mamarias felinas. Sin embargo no existen estudios que permitan asociar la ovariectomía realizada en el momento de la escisión tumoral mamaria con el tiempo de supervivencia.

Signos clínicos

Las hembras afectadas presentan una o múltiples masas, más de la mitad de las gatas poseen varias mamas implicadas y muchas de ellas presentan compromiso de ambas cadenas mamarias (Ogilvie 1983). Los tumores mamarios son generalmente nódulos firmes aunque a veces pueden ser blandos, comprometen o no tejidos profundos o piel, su diámetro varía entre algunos milímetros y 10 cm (Ogilvie 1983) (Foto 1 y 2). Aproximadamente el 25% de los pacientes presentan masas ulceradas (Foto 2, Wintrow y col. 1996). Los pezones de las mamas afectadas pueden exudar fluido amarillento o amarronado. El compromiso linfático se evidencia como finas cuerdas localizadas en el tejido subcutáneo. Puede presentarse linfoedema en uno o más miembros. A la palpación los ganglios linfáticos afectados se presentan firmes y aumentados de tamaño. El índice metastásico es alto siendo el pulmón y los ganglios linfáticos los sitios de metástasis más frecuentes. Variados signos clínicos pueden aparecer relacionados con la ocurrencia de metástasis en diferentes localizaciones (pulmones, pleura, tejido linfático, hígado, esqueleto, riñones. Bazo). Cuando las metástasis pulmonares y torácicas son extensas se asocian a insuficiencia respiratoria, así mismo la emaciación se asocia a metástasis generalizada.

Diagnóstico

El diagnóstico de los tumores mamarios se realiza mediante la identificación de las masas por palpación de la glándula y el estudio histopatológico del tumor. Los estudios citológicos realizados a partir de improntas de las regiones ulceradas o de secreción del pezón pueden aproximar el diagnóstico, sin embargo la ausencia de células neoplásicas no descarta la presencia de tumor. Se requiere una biopsia excisional y el correspondiente estudio histopatológico para arribar al diagnóstico definitivo. No está indicada la realización de biopsia insicisional debido a que la maniobra puede promover la diseminación linfática o hemática de células neoplásicas. Los tumores de pequeños diámetro (<2cm), con pocas figuras mitóticas, tamaño nuclear y forma regular se asocian en general con un pronóstico más favorable. Los métodos complementarios de diagnóstico incluyen radiografía de tórax con el fin de investigar la presencia de metástasis pulmonares (Foto 3). Estas metástasis se visualizan como áreas radiodensas circulares, bien definidas o difusas a patrón intersticial. Las metástasis óseas se visualizan radiológicamente como focos osteolíticos irregulares. Los estudios ultrasonográficos de abdomen permitirán evidenciar metástasis en órganos y tejidos abdominales. Los diagnósticos diferenciales de las neoformaciones mamarias felinas incluyen quistes de retención en la pos lactación y fibroadenomatosis mamaria. Estudios hematológicos de

bioquímica serica y uroanálisis permitirán identificar alteraciones sistémicas asociadas al tumor (Stornelli y col. 2004, Stornelli y col. 2005).

Tratamiento

Las opciones terapéuticas del estado de la enfermedad, la escisión quirúrgica, quimioterapia, inmunoterapia, así como terapia con bloqueadores de receptores hormonales, han sido utilizadas como terapéutica para el tratamiento de las neoplasias mamarias felinas. La sobrevida promedio de un animal entre la detección del tumor y la muerte se estima en doce meses cuando no se instaura un plan terapéutico (Hahn y Adams 1997). La cirugía radical se recomienda en la mayoría de los casos. Esto se debe a la naturaleza invasiva de los tumores malignos y a la tendencia a producir metástasis tempranas. Luego de la cirugía, la incidencia de recurrencias y metástasis es alta (Hayes y col. 1981).

Diferentes tipos de cirugías han sido comunicados en el tratamiento de neoplasias mamarias:

- 1) Remoción del tumor.
- 2) Remoción de la glándula comprometida.
- 3) Remoción de la glándula afectada y ganglios linfáticos relacionados.
- 4) Remoción de los ganglios relacionados, media cadena o la cadena entera según la mama afectada.
- 5) Remoción de la cadena mamaria y de los ganglios regionales.
- 6) Mastectomía bilateral y remoción de los linfonódulos axilares e inguinales. La mastectomía bilateral con remoción de los ganglios axilares e inguinales realizada en dos tiempos, una cadena por vez con un intervalo de 15 días entre cada cirugía, es la opción más aconsejable por tres razones

1. La remoción y estudio histopatológico de los ganglios linfáticos proveen información sobre el pronóstico (Stornelli y col. 2005).

2. La cirugía radical se asocia con una sobrevida más larga comparado con animales en los que solo se realiza la resección de la glándula afectada y las glándulas adyacentes (MacEwen y col. 1984).

3. Las glándulas mamarias clínicamente normales pueden contener células neoplásicas, lo mismo puede ocurrir con los ganglios linfáticos (Stornelli y col. 2005).

No existe ninguna evidencia de que la radioterapia mejore la supervivencia y/o calidad de vida en los casos de tumores mamarios felinos. Si bien se ha comunicado el uso de protocolos de quimioterapia la respuesta al tratamiento ha sido pobre (Hahn y col. 1997). Algunos animales tratados han tenido una sobrevida más larga en comparación con los no tratados. Se ha comunicado como exitoso un protocolo combinado de doxorubicina (25-30mg/m² IV) y

ciclofosfamida (5-100mg/m² oral), administrada los días 3, 4, 5 y 6 luego de la administración de doxorubicina. Este protocolo se repite con un intervalo de 21 días. Produciéndose una remoción parcial o completa en el 50% de los pacientes con metástasis o neoformación mamaria no resecable. Los efectos adversos del tratamiento incluyen anorexia moderada y mielosupresión. Estos efectos colaterales pueden reducirse reduciendo la dosis de doxorubicina (20 mg/m²) y aumentando el intervalo entre tratamientos a 5 semanas (Jhonston 2001). Un estudio realizado sobre 67 gatos con adenocarcinomas mamarios confirmados histológicamente, tratados con doxorubicina (1mg/kg por vía i.v.) cada 3 semanas utilizando 5 tratamientos como máximo, mostró un aumento significativo de la sobrevida de los pacientes (Novosad y col 2006)

Diferentes estudios han demostrado que los tratamientos basados en inmunoterapia no han sido efectivos. La terapia con antiestrógenos (ej tamoxifeno) no se ha asociado a regresión. No existen evidencias de que la ovariectomía sea beneficiosa en gatas enteras con tumores mamarios (Jhonston 2001).

Pronóstico

A pesar de los estudios realizados, poco se ha progresado en relación al aumento del tiempo de sobrevida de los pacientes afectados. La sobrevida desde la detección del tumor hasta la muerte no supera los doce meses cuando no se ha realizado el diagnóstico temprano de la masa tumoral.

Siete factores se relacionan con el pronóstico de las neoplasias mamarias en felinos:

Edad de la hembra en el momento del diagnóstico. La sobrevida es menor en las hembras añosas

Diámetro del tumor primario. La sobrevida es mayor cuando el tumor posee un diámetro inferior a 2cm (2 a 3 años). Los tumores de diámetro mayor a 3 cm se relacionan con sobrevida corta (4 a 6 meses)

Compromiso del ganglio linfático regional. La sobrevida es mayor si el ganglio regional no está comprometido. En un estudio se observó que en el 49% de los pacientes involucrados poseían metástasis en los ganglios linfáticos regionales, pero solo el 10% fue palpable clínicamente. Este hecho es razón suficiente para realizar la mastectomía radical incluyendo los ganglios inguinales en todos los pacientes. Con respecto a los ganglios axilares, debido a su localización, estaría solo indicado removerlos en aquellos pacientes que presentan aumento de tamaño o citología positiva (Wintrow y col. 1996).

Presencia de metástasis en el momento del primer examen físico. La presencia de metástasis se asocia a una menor sobrevida.

Numero de figuras mitóticas en el tejido tumoral, existiendo una larga sobrevida con menos de dos figuras mitóticas por campo microscópico a mayor aumento.

Necrosis del tumor primario. Mayor sobrevida con necrosis mínima.

Clasificación histopatológica de la masa resecada. El factor de pronóstico para los tumores malignos es el grado de diferenciación nuclear. Tumores bien diferenciados con pocas figuras mitóticas indican periodos más largos de sobrevida (Wintrow y col 1996, Ortega García y col. 2013).

Los factores de pronóstico más significativos en la recurrencia y sobrevida son el tamaño del tumor y la clasificación histopatológica. Otros factores como la raza, localizaciones múltiples, volumen tumoral, ulceración, crecimiento infiltrativo, pleomorfismo, infiltración inflamatoria crónica, tipo de cirugía implementada (en bloque o localizada), pueden relacionarse con el diagnóstico de la enfermedad. Los gatos de pelo largo poseen menor sobrevida ya que poseen más frecuentemente tumores con compromiso linfático y gran tamaño. Un estudio realizado ha demostrado que existe una correlación positiva entre el factor de crecimiento endotelial vascular y pronóstico desfavorable (Millanta y col. 2002)

La incidencia de los tumores mamarios felinos así como la alta frecuencia de malignidad marcan la necesidad de realizar un examen mamario completo cuando se realizan los exámenes médicos de rutina. Las hembras intactas poseen mayor riesgo de padecer tumores mamarios si se las compara con hembras ovariectomizadas antes de la pubertad, por lo cual es importante orientar al propietario hacia una castración temprana no solo para evitar en forma permanente la reproducción de las hembras, sino también como medio de prevención de los tumores mamarios. Debido a que aproximadamente el 80% de las neoplasias mamarias felinas presentan signos de malignidad, deben ser diagnosticadas precozmente y en forma conjunta implementar una terapia agresiva. Controles médicos periódicos permitirán realizar un diagnóstico temprano de las lesiones neoplásicas e instaurar un tratamiento adecuado a fin de mejorar el pronóstico de la enfermedad.

Bibliografía

- Bonnett, B.N.; Egenvall, A.; Hedhammar, A.; Olson P. (2005). "Mortality in over 350,000 insured Swedish dogs from 1995-2000: I. Breed-, gender-, age- and causespecific rates". *Acta. Vet. Scand.*, 46 (3), pp. 105-120.
- Cheang, M.C.; Voduc, D.; Bajdik, C.; Leung, S.; McKinney, S.; Chia, S.K.; Perou, C.M.; Nielsen, T.O. (2008). "Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype". *Clin Cancer Res.*, 14(5), pp. 1368-1376.
- De María, R.; Olivero, M.; Lussich, S.; Nakaichi, M.; Murata, T.; Biolatti, B.; Di Renzo F. (2005). "Spontaneous feline mammary carcinoma is a model of HER2 overexpressing poor prognosis human breast cancer". *Cancer Res.*, 65, pp. 907-912.
- de las Mulas, J.M.; van Niel, M.; Millan, Y. (2000). "Immuno-histochemical analysis of estrogen receptors in feline mammary gland benign and malignant lesions: comparison with biochemical assay". *Domestic Animal Endocrinology*, 18, pp. 111–125.
- Flores, A.R.; Rêma, A.; Carvalho, F.; Faustino, A.; Dias Pereira, P. (2014). "Reduced expression of claudin-2 is associated with high histological grade and metastasis of feline mammary carcinomas". 150(2-3), pp. 169-74.
- Hayden, D.W.; Nielsen, S.W. (1971). "Feline mammary tumors2. J small Anim pract. 12, pp. 687-697.
- Hahn, K.A.; Adams, W.H. (1997). "Feline mammary neoplasia: biological behavior, diagnosis and treatment alternatives". *Feline Pract.*, 25, pp. 5-11
- Hayes, H.M.; Milne, K.M.; Mandell, C.P. (1981). "Epidemiologic features of feline mammary carcinomas". *Vet. Rec.* 108, pp. 476.
- Hughes, K.; Dobson, J.M. (2012). "Prognostic histopathological and molecular markers in feline mammary neoplasia". *Vet J.*, 194(1), pp. 19-26.
- Johnston S; Root Kustritz M; Olson P. (2001). "Canine and Feline Theriogenology". Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- Kim, M.J.; Ro, J.Y.; Ahn, S.H.; Kim, H.H.; Kim, S.B.; Gong G. (2006). "Clinicopathologic significance of the basal-like subtype of breast cancer: a comparison with hormone receptor and Her2/neu-overexpressing phenotypes". *Hum Pathol.* 37, pp. 1217-1226.
- Kustritz MV. (2007). "Determining the optimal age for gonadectomy of dogs and cats". *J Am Vet Med Assoc.*, 231 (11), pp. 1665-75.
- McAloose, D.; Munson, L.; Naydan, D.K. (2007). "Histologic features of mammary carcinomas in zoo felids treated with melengestrol acetate (MGA) contraceptives". *Veterinary Pathology* 44, pp. 320–326.
- Millanta, F.; Lazzeri, G.; Mazzei, M.; Vannozzi, I.; Poli, A. 2002. "MIB-1 Labeling index in feline dysplastic and neoplastic mammary lesions and its relationship with post surgical prognosis". *Veterinary Pathology.* 39, pp 120-126.

- Millanta, F.; Calandrella, M.; Bari, G.; Niccolini, M.; Vannozzi I.; Poli A. (2005). "Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues". *Res Vet Sci.*, 79, pp.225-232.
- Mol, J.A.; van Gardener, E.; Ruttenan, G.R.; Rijnberk, A. (1990). "New insights in the molecular mechanism of progestin induced proliferation of mammary epithelium induction of the local biosynthesis of growth hormone (GH) in the mammary gland of dogs, cats and human". *Acta endocrinol.* 125, pp45-50.
- Mol, J.A.; Van Garderen, E.; Rutteman, G.R.; Rijnberk A. (1996). "New insights in the molecular mechanism of progestin-induced proliferation of mammary epithelium: induction of the local biosynthesis of growth hormone (GH) in the mammary glands of dogs, cats and humans". *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 57, 1-2, pp. 67-71.
- Morris J. (2013) "Mammary tumours in the cat: size matters, so early intervention saves lives". *J Feline Med Surg.* 15(5):391-400.
- Novosad, C.A.; Bergman, P.J.; O'Brien, M.G. (2006). "Retrospective evaluation of adjunctive doxorubicin for the treatment of feline mammary gland adenocarcinoma: 67 cases". *Journal of the American Animal Hospital Association.* 42, pp. 110–120
- Ogilvie, G.K. (1983). "Feline mammary neoplasia". *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.* 5, PP.385-391.
- Ordás, J.; Millán. Y.; Dios, R.; Reymundo, C.; Martín de las Mulas, J. (2007). "Proto-oncogen HER-2 in normal, dysplastic and tumorous feline mammary glands: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study". *BMC. Cancer*, 7, 179.
- Ortega García, M.V.; Galán Torres, J.A.; Millán Ruiz, Y.; Sánchez Céspedes, R.; Martín de las Mulas González-Albo J. (2013). "Clasificación en subtipos moleculares de tumores de mama de pequeños animales mediante métodos inmunohistoquímicos". *Sanid. mil.* 69, 1. pp 6-12.
- Overley, B.; Shofer, F.S.; Goldschmidt, M.H.; Sherer, D.; Sorenmo, K.U. (2005). "Association between ovariectomy and feline mammary carcinoma". *J Vet Intern Med.*, 19 (4), pp. 560-563.
- Rutteman, G.R.; Withrow, S.J.; MacEwen, E.G. (2001). "En: Withrow SJ, MacEwen BR (eds)". *Tumors of the mammary gland. In Small Animal Clinical Oncology.* 455-477. Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- Skorupski, K.A.; Overley, B.; Shofer, F.S. (2005). "Clinical characteristics of mammary carcinoma in male cats". *Journal of Veterinary Internal Medicine* 19, 52–55.
- Stornelli, M.C.; Savignone, C.A.; Stornelli, M.A. (2004). "Afecciones de la glándula mamaria en felinos". *Anuario de Asociación Argentina de Medicina Felina*, pp. 60-64.
- Stornelli, M.C.; Leone, F.L.; Massone, A.R.; Stornelli, M.A. (2005). "Tumor mamario en un macho felino: descripción de un caso clínico". *Anuario de la Asociación Argentina de Medicina Felina*, pp. 73-75.
- Tomlinson, M.J.; Barteaux, L.; Ferns, L.E.; Angelopoulos, E. (1984). Feline mammary carcinoma: a retrospective evaluation of 17 cases. *Can. Vet.* 125, pp. 435-439.

- Winston, J.; Craft, D.M.; Scase, T.J.; Bergman, P.J. (2005). "Immunohistochemical detection of HER-2 expression in spontaneous feline mammary tumors". VCO, 3, pp.8-15.
- Wintrow, J.S.; McEwen, G.E. (1996). Small Animal Clinical Oncology. Philadelphia: BW Saunders.



Foto1: Tumor mamario en mama torácica.



Foto 2: Tumor mamario ulcerado.

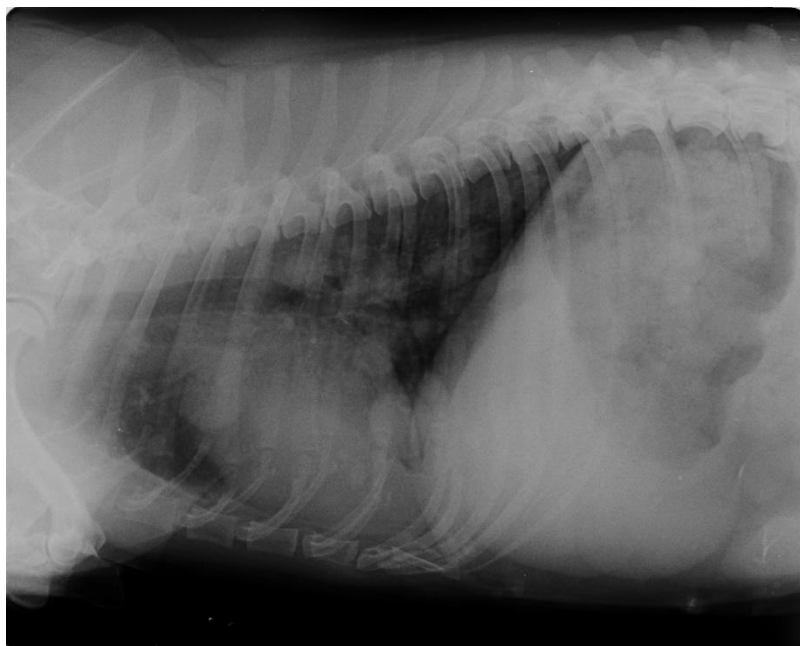


Foto 3: Metástasis pulmonar a partir de un tumor mamario

CAPITULO 24

Enfermedades reproductivas de la hembra felina

María Carla García Mitacek

Complejo Hiperplasia Endometrial Quística – Piómetra

La hiperplasia endometrial quística (HEQ) es una afección uterina producida por la acción de la progesterona (P_4) sobre el endometrio (Feldman y Nelson, 2000; Giménez y col., 2006). Los cambios endometriales ocurridos en la HEQ siempre anteceden a la ocurrencia de piómetra (PI) tanto en gatas como en perras (Nelson y Feldman, 1982; Nelson y Feldman, 1986). El complejo HEQ-PI es una alteración uterina acompañada de contaminación bacteriana proveniente de vagina, lo que da como resultado una colecta uterina purulenta (Johnston y col., 2001). Las bacterias más comúnmente aisladas del fluido uterino de gatas con piómetra son: *Escherichia coli*, *Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Pasteurella* sp., *Klebsiella* sp., *Moraxella* sp. y *Pseudomonas* sp. (Johnston y col., 2001). Los signos clínicos son: inapetencia, polidipsia, poliuria, depresión, anorexia, pérdida de peso y descarga vaginal purulenta en casos de piómetras a cuello abierto. El examen clínico puede complementarse con un estudio ultrasonográfico, citología vaginal, hemograma y bioquímica sanguínea (Johnston y col., 2001; Harvey, 1998). Los hallazgos ecográficos incluyen un aumento del tamaño del cuerpo y

cuernos uterinos, el diámetro puede ser de algunos milímetros o llegar a medir varios centímetros. El contenido uterino suele ser homogéneo y anecoico con fuerte refuerzo posterior, o puede ser hipoecogénico. La pared uterina puede presentar un aspecto variable, de lisa a irregular, de delgada a gruesa o presentar variaciones segmentales en el grosor (Nyland y Mattoon, 2002; Fritsch y Gerwing, 1996). Al realizar la citología vaginal puede visualizarse predominio de células intermedias, polimorfonucleares y bacterias. En los estudios hematológicos puede observarse leucocitosis, neutrofilia con desvío a la izquierda, y en ciertos casos azotemia e hiperproteinemia (Johnston y col., 2001).

Si bien la ocurrencia de esta afección es más frecuente en la perra, en la gata constituye también una afección grave que compromete la vida del paciente (Johnston y col., 2001). La mayoría de las gatas presentan ovulación inducida por el coito, sin embargo algunas ovulan espontáneamente (Giménez y col., 2006; Giménez y col., 2007; Silva-Molano y Loaiza-Echeverri, 2007). Aquellas gatas que ovulan en forma inducida y no quedan preñadas o las que ovulan espontáneamente, presentan cuerpos lúteos persistentes (pseudopreñez) y concentraciones séricas de P_4 elevadas durante 45 días aproximadamente (Verstegen y col., 1998). Es así que tanto la pseudopreñez como la administración de progestágenos exógenos en dosis repetidas o prolongadas en el tiempo, con el fin de suprimir ciclos estrales, son factores predisponentes de HEQ-PI. La HEQ-PI debe ser tratada tan pronto como es diagnosticada ya que la velocidad de resolución del problema está directamente relacionada con el pronóstico de la enfermedad (Verstegen, 2002).

El tratamiento puede ser quirúrgico o médico. El tratamiento quirúrgico consiste en la ovariectomía, acompañado de un tratamiento médico a base de antibioticoterapia sistémica y fluidoterapia (Foto 1). Sin embargo, en aquellas gatas que forman parte de un plantel reproductivo y se plantea la necesidad de conservar la fertilidad puede realizarse un manejo médico. Los protocolos utilizados para tratar esta afección consisten en la administración de prostaglandina $F_{2\alpha}$ (PG $F_{2\alpha}$) natural, análogos sintéticos o antiprogestágenos (Johnston y col., 2001; Nelson y Feldman, 1986; Verstegen, 1998; Verstegen 2002).

La PG $F_{2\alpha}$ natural y los análogos sintéticos producen un descenso de los niveles de P_4 , al inducir la lisis del cuerpo lúteo. A su vez tienen la particularidad de estimular las contracciones uterinas y relajar el cuello del útero por lo que permiten expulsar el contenido del mismo. Se debe tener en cuenta que los análogos sintéticos de la PG $F_{2\alpha}$ son más potentes que la PG $F_{2\alpha}$ natural, por tal motivo la dosis a utilizar debe ser inferior. Los efectos colaterales de ambas pueden manifestarse a los pocos minutos de su administración observando jadeo, lordosis, salivación, vocalización, diarrea, vómitos e inquietud (Verstegen 2002; Wiebe y Howard, 2009).

Se han realizados diferentes estudios para el tratamiento de la piómetra en perras administrando PG $F_{2\alpha}$ natural y sintética (Hubler y col., 1991; Meyers-Wallen, 1986; Nelson y Feldman, 1982) sin embargo existen pocos estudios en gatas. Se comunicaron buenos resultados en el tratamiento con PGF $_{2\alpha}$ natural una dosis de 0.1 mg/kg por vía subcutánea dos

veces al día, durante 5 días, junto con una antibioticoterapia (Feldman y Nelson, 2000). En un estudio se trataron 32 gatas con piómetra de cuello abierto y en 8 con endometritis posparto (Feldman y Nelson, 2000). Al examen físico realizado 14 días más tarde todas las gatas se encontraron sin signología clínica, 39 de las 40 presentaron estro normal dentro de los 4 meses de finalizado el tratamiento. Treinta y siete de los animales tratados dieron a luz crías vivas y 3 de éstos volvieron a desarrollar piómetra. Los efectos colaterales observados luego de la administración fueron jadeo, vocalización, intranquilidad, acicalamiento, tenesmo, salivación, diarrea, midriasis, vómitos, micción y lordosis (Feldman y Nelson, 2000).

El uso de PG sintética ha sido poco documentado en la gata. Los escasos datos publicados sobre el uso de cloprostenol en gatas sugieren que podría ser una alternativa eficaz para el tratamiento de la piómetra. Las ventajas de utilizar PG sintética, son la reducción de los efectos colaterales y la administración durante un período más corto. (Wiebe y Howard, 2009). García Mitacek y col., administraron 5 µg/kg/día de cloprostenol subcutáneo durante 3 días, acompañado de antibioticoterapia sistémica (20 mg/kg/día amoxicilina intramuscular durante 7 días) en gatas que presentaban piómetra a cuello abierto. Todas las gatas tratadas remitieron los signos clínicos completamente luego de 15 días de iniciado el tratamiento, retornaron la ciclicidad y un 40 % de las gatas quedaron peñadas en el primer servicio postratamiento. La totalidad de las gatas permanecieron clínicamente sanas desde el tratamiento hasta que finalizó el estudio (entre 7 y 10 meses postratamiento). Los efectos colaterales observados luego de la administración del cloprostenol fueron: diarrea, vómitos y vocalizaciones. Por lo tanto, el cloprostenol es una alternativa del tratamiento médico para aquellas gatas que presentan piómetra a cuello abierto, ya que en los animales tratados remitió el cuadro de enfermedad, desapareciendo los signos clínicos y retornando la ciclicidad (García Mitacek y col., 2014).

Otra opción terapéutica utilizada para el tratamiento de piómetra ha sido el uso de antiprogéstágenos, los cuales bloquean los receptores de P_4 presentes en el útero, por lo cual interfieren con las acciones de la hormona. Deniz Nak y col., administraron en gatas que presentaban piómetra 10 mg/kg de aglepristone subcutáneo los días 1, 2, 7 y 14 luego del diagnóstico de piómetra (Deniz Nak y col., 2009). Conjuntamente administraron trimetoprima/sulfa 15 mg/kg/día subcutáneo durante 7 días. De las 10 gatas tratadas, 9 respondieron al tratamiento, presentando una condición general y reproductiva normal durante los 2 años posteriores al tratamiento, mientras que en la gata restante fue necesario practicar una ovariosterectomía. No se observaron efectos colaterales en ninguno de los animales tratados. Sin embargo, en la actualidad estas drogas no están disponibles en nuestro país.

Hidrómetra y Mucómetra

La hidrómetra o mucómetra es la acumulación intraluminal de líquido seroso - mucosoide estéril, puede ocurrir también en relación a HEQ y preceder la ocurrencia de piómetra (Johnston y col., 2001). Generalmente puede observarse una distensión de las paredes uterinas y una atrofia del endometrio. Los signos clínicos pueden estar ausentes u observarse distensión abdominal. El tratamiento consiste en la ovariectomía (Johnston y col., 2001).

Anomalías congénitas

Las anomalías descritas en las gatas incluyen: aplasia segmental (cuerno, cuerpo y/o cuello uterino), hipoplasia uterina y duplicación de los cuernos uterinos. Sin embargo, estas patologías son poco frecuentes de hallar en hembras felinas (Johnston y col., 2001).

Neoplasias uterinas

Los tumores epiteliales (adenoma, adenocarcinoma) y mesenquimales (fibroma, fibrosarcoma, leiomioma, leiomiocarcinoma, lipoma, linfoma) han sido descritos en hembras felinas, sin embargo son de escasa presentación. Los tumores generalmente son diagnosticados cuando se realiza la ovariectomía o postmortem (Foto 2; Johnston y col., 2001).

Bibliografía

- Deniz Nak, YN., Bilginer T. (2009). "Follow-up examinations after medical treatment of pyometra in cats with the progesterone-antagonist aglepristone". *Journal of Feline Medicine and Surgery* (11), pp. 499-502.
- Feldman, E.; Nelson, R. (2000). "Endocrinología y reproducción en perros y gatos". México:McGraw-Hill Interamericana. pp. 657-671, 826-829.
- Fieni, F. (2006). "Clinical evaluation of the use of aglepristone, with or without cloprostenol, to treat cystic endometrial hyperplasia-piometra complex in bitches". *Theriogenology*. (66), pp. 1550–1556.
- Fritsch, R., Gerwing, M. (1996). *Ecografía de perros y gatos*. Acribia editorial, Zaragoza, España.
- García Mitacek, MC.; Stornelli, MC.; Tittarelli, CM.; Nuñez Favre, R.; de la Sota, RL.; Stornelli, MA. (2014). "Cloprostenol treatment of feline open-cervix pyometra". *Journal of Feline Medicine and Surgery*. Online ISSN: 1532-2750. Impresa ISLSN: 1098-612X. 16 (2): pp. 177-179.
- Giménez, F.; Stornelli, MC.; Savignone, CA.; Tittarelli, CM.; de la Sota, RL.; Stornelli, MA. (2006). Reproductive physiology and contraception in queen. *Analecta Veterinaria*, 26(1): pp. 38-43.
- Giménez, F.; Stornelli, MC.; Savignone, CA.; Tittarelli, CM.; García Mitacek, MC.; de la Sota, RL.; Stornelli, MA. (2007). "Ocurriencia de ovulaciones espontáneas en una población controlada de gatos domésticos". VIII Jornadas de Divulgación Técnico Científicas. Facultad de Ciencias Veterinarias – UNR. ISSN 1667-9326, pp 87-88.
- Harvey, M. (1998). "*Conditions of the non-pregnant female*". En: Simpson GM, England GCW y Harvey M (eds). *BSAVA manual of small animal reproduction and neonatology*. (pp 35–51). Quedgeley: British Small Animal Veterinary Association.
- Hubler, M.; Arnold, S.; Casal, M.; Flückiger, M.; Hauser, B.; Corboz, L.; Rüsch, P. (1991). "Use of a low dose prostaglandin F2 alpha in bitches". *Schweiz Arch Tierheilkd*. 133 (7): pp. 323-9.
- Jhonson, CA. (2000). "*Anormalidades del ciclo estral*". En Nelson RW, Coutto GC, editores. *Medicina interna de animales pequeños*. Segunda edición. (pp. 891-917). Buenos Aires: Inter.-Médica. 2000.
- Johnston, SH.; Root Kustritz, MV.; Olson, PN. (2001). "Disorders of the feline uterus and uterine tubes (oviducts)". En *Canine and feline theriogenology*. pp. 463-473.
- Meyers-Wallen, VN.; Goldschmidt, MH.; Flickinger, GL. (1986). "Prostaglandin F2 alfa treatment of canine pyometra". *J Am Vet Med Assoc*. 15;189(12): pp. 1557-61.
- Nelson, RW.; Feldman, EC.; Stabenfeldt, GH. (1982). "Tretment of canine pyometra and endometritis with prostaglandin F2 alpha". *J Am Vet Med Assoc*. 1;181(9): pp. 899-903.

- Nelson, RW.; Feldman, EC. (1986). "Pyometra". Vet Clin North Am Small Anim Pract. 16(3): pp. 561-76.
- Nyland, TG.; Mattoon, JS. (2002). "*Ovarios y útero*". En Nyland TG, Mattoon JS. Diagnóstico ecográfico en pequeños animales. (pp.240-259) Segunda edición, Barcelona, España. Ed. W.B.S. Company.
- Silva-Molano, RF.; Loaiza-Echeverri, AM. (2007). "Piómetra en animales pequeños". Vet.zootec. 1(2). pp. 71-86.
- Stornelli, MA. (2007). "Physiological aspects of feline reproduction". Brazilian journal of animal reproduction. Pp. 71-76.
- Verstegen, J. (2002). "*Reproducción felina*". En: Ettinger SJ, Feldman EC, editores. Tratado de medicina interna veterinaria. Quinta ed, ed. Inter-Médica. Buenos Aires. pp. 1764-1780.
- Verstegen, J (1998). "*Physiology and Endocrinology of Reproduction in female cats*". En: Simpson GM, England GCW, Harvey M, editores. Manual of small animal reproduction and neonatology. (pp. 11-16). First ed, ed. U.K.B.S.A.V. Association.
- Wiebe, VJ.; Howard, JP. (2009). "Pharmacologic Advances in Canine and Feline Reproduction". Topical review. (24) pp. 71-99.

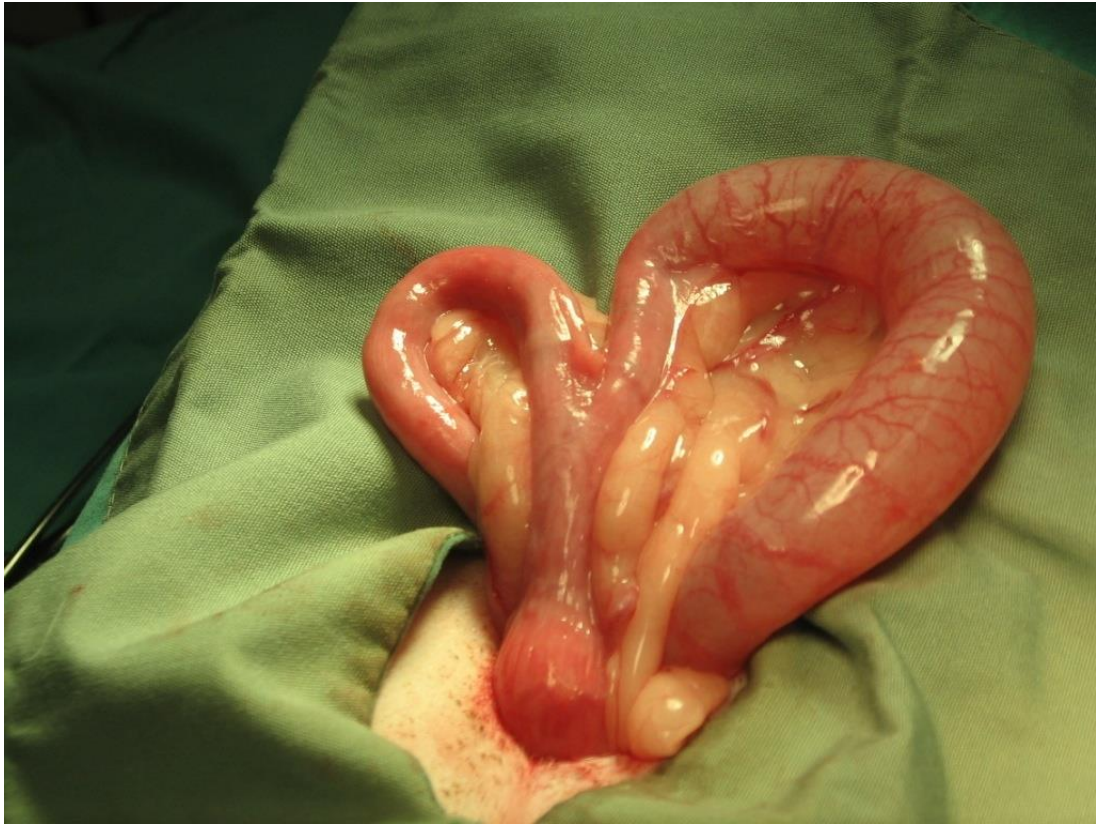


Foto 1: Piómetra



Foto 2: Tumor uterino.

PARTE VI

Control de la reproducción

María Carla García Mitacek, María Cecilia Stornelli



CAPITULO 25

Anticoncepción en la perra y en la gata

María Cecilia Stornelli

Introducción

El control de la reproducción orientado a evitar nacimientos indeseados en la hembra canina puede realizarse mediante contracepción permanente (esterilización) o temporaria, interrupción de la gestación (aborto)

Existen numerosas razones por las que un propietario puede requerir la implementación de un método de contracepción. El mismo debe ser seguro y eficaz; y dependiendo de los requerimientos del propietario puede optarse por métodos permanentes o temporarios. Los métodos temporarios pueden indicarse cuando una reproductora asiste a exposiciones caninas o participa de viajes con sus dueños y siempre se debe considerar que la contracepción reversible debería solo implementarse cuando la hembra va a ser usada como reproductora; ya que en la actualidad son bien conocidos los beneficios de realizar la esterilización temprana de las perras. Los tumores mamarios, ováricos, los quistes de ovario y la piómetra son algunos de los ejemplos de las afecciones que pueden prevenirse o disminuir su incidencia cuando se realiza la esterilización temprana. Un beneficio significativo de la esterilización quirúrgica temprana (antes del primer celo), es la disminución considerable en la ocurrencia de neoplasias mamarias.

Una razón adicional y no menos importante para la implementación de la esterilización es evitar la sobrepoblación y la presencia de animales callejeros evitando tanto el sufrimiento animal como la transmisión de enfermedades zoonóticas y no zoonóticas.

Métodos permanentes para el control de la reproducción

Métodos Quirúrgicos

La ovariectomía (OV) y ovariohisterectomía (OVH) han sido implementadas por varias décadas para realizar la prevención permanente de la gestación en la hembra. Estos métodos no solo impiden la gestación sino que también evitan el comportamiento y los signos externos que ocurren en la hembra en celo y que en muchas ocasiones causan incomodidad a los propietarios.

La OV y OVH: son los métodos quirúrgicos utilizados para el control de la reproducción en la hembra canina y felina. Las complicaciones intra y post quirúrgicas inmediatas de estos procedimientos son mínimas. La obesidad se asocia frecuentemente a la OV y OVH. La incontinencia urinaria que responde a estrógeno ha sido comunicada en el 3 al 20 % de las perras sometidas a OV u OVH. Esta afección se asocia a una incompetencia hipoestrogénica en el esfínter uretral. Los estrógenos incrementan la afinidad de los receptores α adrenérgicos por los neurotransmisores simpáticos en el esfínter uretral y aumentan el tono del mismo, es así que la falta de soporte hormonal se asocia a incontinencia urinaria (Arnold, 1992; Johnston y col.; 2001).

Es importante remarcar las ventajas y desventajas de la castración en relación al método utilizado (OVH u OV) y al momento de la implementación del acto quirúrgico (antes o después del primer celo o después de varios celos).

La castración temprana, antes de la pubertad reduce la incidencia de tumores mamarios en perras y gatas (Overley, 2005; Kustritz, 2007). Así mismo la extirpación del útero y ovarios a cualquier edad previene enfermedades reproductivas como HEQ-piometra y neoplasias ováricas (Potter, 1991, Johnston y col.; 2001).

Cuando se realiza la ligadura de trompas o salpingectomía con o sin histerectomía, se evitan las preñeces en la hembra pero ocurren ciclos ováricos, por lo tanto permanecerán en la hembra todas las manifestaciones conductuales asociadas al estro, así como la posibilidad de enfermedades ováricas y uterinas en las opciones en las que se conserva el útero (Feldman y col.; 2007). Estos métodos no se utilizan de rutina, debido a que no tienen ventajas sobre los anteriores y no se disminuye la incidencia de afecciones reproductivas en la hembra.

Esterilización Química

Se han estudiado y desarrollado varias drogas para provocar la esterilización química en caninos. Estos métodos se utilizan en machos, mediante la administración intratesticular, y en el conducto deferente, causando esclerosis y esterilidad (Maseei y col., 2013; Robbins y col., 2004). Para la implementación de la esterilización química pueden utilizarse agentes esclerosantes (formalina al 3,5% en solución salina bufferada; gluconato de clorhexidina al 50%), así como Freund's complete adjuvant (FCA) compuesto por Bacilo Calmette Guérin (BCG) muertos por calor, que causarán reacción inflamatoria local, respuesta autoinmune y desarrollo de anticuerpos anti espermatozoides (Kutzler y col., 2006).

Métodos temporarios para el control de la reproducción

Métodos Mecánicos

Los dispositivos intravaginales para el control de la reproducción han sido utilizados en el pasado, pero han caído en desuso debido a las complicaciones causadas, entre las que se comunicaron infecciones vaginales y perforación de la pared vaginal (Johnston y col., 2001).

Métodos farmacológicos

Los protocolos farmacológicos brindan una opción temporaria y reversible del control de la reproducción

Métodos hormonales

Diversas hormonas esteroides tales como progestágenos, andrógenos y estrógenos han sido usadas para inhibir la reproducción en caninos domésticos.

Progestágenos

Los progestágenos administrados durante el anestro evitan la ocurrencia de celos ya que actúan sobre el eje hipotálamo – hipofisario - gonadal interfiriendo con la secreción de gonadotrofinas e impidiendo el inicio de un nuevo ciclo.

Cuando los progestágenos son administrados en el proestro temprano impiden el desarrollo folicular así como la onda de LH y la ovulación.

Tanto la eficacia como los efectos indeseables varían con la droga utilizada, el momento del ciclo en el que se administra, así como la edad y el estado de salud de la hembra (Kutzler y col., 2006; Romagnoli, 2003). Se ha comunicado también que las progestinas ejercen acción anticonceptiva actuando sobre el endometrio (Munson, 2006).

Acetato Medroxiprogesterona: es un progestágeno de larga duración. Si bien han sido descritos los implantes subcutáneos, esta droga se utiliza generalmente como inyección periódica, siendo recomendable administrarla durante el anestro para prevenir el estro.

La dosis mínima efectiva es de 2mg/kg IM, cada tres meses o 3 mg/kg IM cada cuatro meses. El tiempo que transcurre para retornar al estro es variable habiéndose –comunicado rangos de 1,5 a 26 meses. Los efectos indeseables observados incluyen polifagia, supresión adrenal, acromegalia, enfermedades uterinas y neoplasias mamarias.

Acetato de Megestrol: Es un progestágeno sintético que se metaboliza rápidamente cuando se administra por vía oral. Ha sido usado ampliamente como método temporario para suprimir el estro en la perra. El acetato de megestrol ha suprimido el estro en el 92% de las perras cuando se lo usó a una dosis de 2,2 mg/Kg por vía oral durante 8 días, comenzando la administración en el proestro temprano. Los efectos adversos comunicados con el uso prolongado de este compuesto incluyen: aumento del apetito y ganancia de peso, estimulación mamaria con cambios hiperplásicos y neoplásicos, desarrollo de Diabetes Mellitus y piómetra.

Acetato de Clormadinona y acetato de delmadinona: son progestágenos sintéticos de larga acción. El retorno al estro luego de la administración de estas drogas es prolongado. Los efectos adversos comunicados luego del uso de estos fármacos incluyen hiperplasia endometrial quística, mucómetra y piómetra. (Johnston y col., 2001; kutzler y col., 2006).

Aunque los progestágenos han mostrado ser efectivos como contraceptivos en gatos, la administración prolongada de dosis elevadas se ha relacionado con la ocurrencia de efectos indeseables (Munson, 2006), como incremento del apetito y ganancia de peso así como letargia o excitación (Plumb, 2002), hiperplasia endometrial quística y piómetra (Agudelo, 2005.; Tamada, 2003), estimulación mamaria con cambios hiperplásicos que resultan en el complejo hipertrofia/fibroadenoma mamario o en cambios neoplásicos (Hayden, 1989; Loretti, 2005; Misdorp, 1991; Tamada, 2003) y supresión adrenocortical (Chastain, 1981). La administración de estas drogas ha sido también asociada a estimulación de hormona de crecimiento lo que resulta en acromegalia y resistencia insulínica en gatos (Feldman, 2004; Middleton, 1987; Pukay, 1979). Si bien en algunos gatos los signos de Diabetes Mellitus persisten, en general son temporarios y desaparecen al discontinuar la administración de progestágenos (Feldman, 2004). Si bien Proligestone fue desarrollada pensando en disminuir

efectos indeseables de los progestágenos, sin embargo se observó que esta droga, causa los mismos efectos adversos que otros progestágenos (Van Haften, 1989; O'Brien, 2001).

Debido a que ciertas condiciones preexistentes como lesiones mamarias, tumores mamarios microscópicos, diabetes subclínica e hiperplasia endometrial quística pueden ser exacerbadas al administrar progestágenos es importante realizar la adecuada evaluación del estado de salud del paciente. Por lo tanto es imprescindible realizar una anamnesis completa así como un examen físico completo antes de prescribir estas drogas (Romagnoli, 2003).

No se recomienda administrar progestágenos, especialmente aquellos de larga acción (progesterona, medroxiprogesterona), antes de la pubertad. Los estrógenos inducen la síntesis de receptores intracelulares para progesterona, altos niveles de estrógenos incrementan la sensibilidad de los tejidos mamarios a progestágenos generando una respuesta exagerada en la glándula mamaria, lo que resulta en hiperplasia fibroadenomatosa (Loretti, 2005). Es así que no se aconseja el uso de progestinas para el tratamiento del estro persistente en gatas ya que esta condición puede deberse a quistes ováricos, condición en la que no se indican estas drogas (Romagnoli, 2003). Tampoco se aconseja el uso de progestágenos en gatas con descarga vulvar debido a que esta podría ser un signo de piómetra o hiperplasia endometrial quística (Romagnoli, 2003).

Los efectos colaterales adversos de los progestágenos impulsan a la no utilización de los mismos y su reemplazo por métodos farmacológicos alternativos si es posible o métodos permanentes como la OVH o la OV.

Andrógenos

Mibolerona: los andrógenos producen un feedback negativo sobre la pituitaria disminuyendo la secreción de gonadotrofinas. Mibolerona ha sido utilizado para suprimir el estro en perras y gatas. En perras se administra 30 días antes del próximo proestro y previene el siguiente estro. El efecto colateral que se ha comunicado con mayor frecuencia es la hipertrofia del clítoris, observada en algunas gatas y en el 15 a 20% de las perras tratadas con este fármaco, y en menor frecuencia vaginitis (Burke y col., 1977; Kutzler y col., 2006; Plumb, 2008). Debido a que la dosis contraceptiva de Mibolerona es muy cercana a la dosis tóxica habiéndose observado disfunción hepática y tiroidea en gatas (Plumb, 2008).

Si bien Mibolerona es una droga efectiva para evitar ciclos estrales en perras y gatas, los efectos colaterales adversos asociados a su uso desaconsejan su utilización.

Agonistas GnRH:

Estos fármacos causan una regulación decreciente de los receptores para GnRH en la pituitaria y suprimen la liberación de las hormonas folículo estimulante y luteinizante. La administración sostenida por un período largo de tiempo resulta en la desensibilización de las células de la pituitaria a los efectos estimulatorios de GnRH.

En la perra la administración subcutánea de implantes de deslorelin, suprime el estro por más de 27 meses mientras que en gatas la respuesta es variable. La principal desventaja del uso de deslorelin para el control de la reproducción es la ocurrencia de un estro pocos días después de la colocación del implante para luego si inducir un anestro prolongado (Kutzler, 2006; Munson, 2006).

Inmunokontracepción

En las dos décadas pasadas se han realizado diversos estudios para la obtención de una vacuna que suprima la fertilidad tanto en machos como en hembras de caninos y felinos. Las vacunas inmunokontraceptivas actúan induciendo la producción de anticuerpos contra proteínas y hormonas esenciales para la reproducción. Las vacunas inmunokontraceptivas más usadas en animales silvestres actúan contra GnRH (previniendo la ovulación y la espermatogénesis) y zona pelúcida (previniendo la unión ovulo-espermatozoides y la fertilización). Las vacunas anti zona pelúcida han sido usadas en roedores, carnívoros salvajes, equinos, marsupiales y elefantes. Sin embargo no se ha logrado inducir infertilidad en caninos y felinos domésticos utilizando este método (Goericke-Pesch y col., 2014).

Las vacunas anti GnRH estimulan la producción de anticuerpos que se unen a GnRH circulante y previenen la liberación de LH y FSH. Muchas han sido desarrolladas específicamente para el control de poblaciones de cánidos salvajes. En gatos domésticos se logró inducir infertilidad por un año, mientras que en perros no se dispone de datos en relación a la duración del efecto anticonceptivo. Si bien en la mayoría de los animales tratados no se observaron efectos adversos, en algunos casos se comunicaron granulomas en el sitio de administración (Massei y col., 2013).

Implantes de Melatonina

En los últimos años el conocimiento de la fisiología reproductiva felina ha permitido realizar estudios sobre el manejo del fotoperiodo y el uso de Melatonina en reproducción felina. Las variaciones del fotoperiodo producen variaciones de la concentración de melatonina sérica ambos hechos relacionados con la reproducción felina. Es así que tanto el manejo lumínico como el uso de melatonina ha sido utilizado para evitar ciclos estrales en las gatas y disminuir la espermatogénesis en el macho con el fin de controlar la reproducción no deseada en esta especie. Un implante de melatonina de 18 mg de melatonina colocado en interestro es capaz de suprimir los ciclos estrales durante 4 meses en la gata así como reducir la producción espermática y disminuir la calidad seminal en el gato por el mismo periodo de tiempo sin

ocurrencia de efectos adversos y en forma reversible, hechos de suma importancia en reproductores felinos (Gimenez y col., 2009; Nuñez Favre y col., 2014).

Bibliografía

- Agudelo, C F. (2005). "Cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in cats. A review". *Vet Q.*, 27(4), pp.173-82.
- Arnold, S. (1992). "Relationship of incontinence to neutering". *Curr Vet the small Anim Pract.*, 11, pp. 875-877.
- Chastain, C B., Graham, C L., Nichols, C E. (1981). Adrenocortical suppression in cats given megestrol acetate. *Am J Vet Res.*, 42(12), pp.2029-35.
- Feldman, E C, Nelson, R W. (2007). *Endocrinología y Reproducción canina y felina*. Buenos Aires: Intermédica.
- Giménez, F.; Stornelli, M C.; Tittarelli, C.; Savignone, C.; Videla Dorna, I., de la Sota, R L.; Stornelli, M A. (2009). "Suppression of estrus in the domestic cat with subcutaneous melatonin implants". *Theriogenology*. 72, pp. 493-499.
- Goericke-Pesch, S.; Wehrend, A.; Georgiev, P. (2014). "Suppression of Fertility in Adult Cats". *Reprod Dom Anim* 49 (2), 33–40.
- Hayden, D W., Barnes, D M., Johnson, K H. (1989). "Morphologic changes in the mammary gland of megestrol acetate-treated and untreated cats: a retrospective study". *Vet Pathol*. 26 (2), pp.104-13.
- Johnston, S D., Kuztritz, M V R., Olson, P. (2001). "Clinical Approach to infertility in the bitch". "In" ed Johnston, S D., Kuztritz, M V R., Olson, P. *Canine and feline Theriogenology*. (pp. 262-264). Ed. Philadelphia: WB Saunders.
- Kutzler, M A.; Wood, A. (2006). "Non-surgical methods of contraceptions and sterilizations". *Theriogenology* 66 (3), pp. 514-525.
- Kustritz, M V. (2007). "Determining the optimal age for gonadectomy of dogs and cats". *J Am Vet Med Assoc.*, 231 (11), pp. 1665-75.
- Loretti, A P.; Ilha, M R.; Ordas, J.; Martin de las Mulas J. (2005). "Clinical, pathological and immunohistochemical study of feline mammary fibroepithelial hyperplasia following a single injection of depot medroxyprogesterone acetate". *J Feline Med Surg.*, 7(1), pp.43-52.
- Massei, G.; Miller, L A. (2013). Nonsuigical fertility control for managing free-roaming dog populations: a review of products and criteria for field applications. *Theriogenology*, 80, pp. 929-838.
- Middleton, D J., Watson, A D., Howe, C J., Caterson, I D. (1987). Suppression of cortisol responses to exogenous adrenocorticotrophic hormone, and the occurrence of side effects attributable to glucocorticoid excess, in cats during therapy with megestrol acetate and prednisolone. *Can J Vet Res.*, 51(1), pp.60-5.
- Misdorp, W., Romijn A, Hart AA. (1991). Feline mammary tumors: a case-control study of hormonal factors. *Anticancer Res.*, 11(5):1793-7.
- Munson, L. (2006). "Contraception in felids". *Theriogenology*, 66, (1), pp.126-34.

- Núñez Favre, R.; Bonaure, M C.; Praderio, R.; Stornelli, MC.; de la Sota, R L.; Stornelli, M A. (2014). "Effect of melatonin implants on spermatogenesis in the domestic cat (*Felis silvestris catus*)". *Theriogenology*, 82, pp.851-856.
- O'Brien, C R.; Wilkie, J S.; (2001). "Calcinosis circumscripta following an injection of proligestone in a Burmese cat". *Aust Vet J.*, 79, (3), pp.187-9.
- Overley, B.; Shofer, F S.; Goldschmidt, M H.; Sherer, D.; Sorenmo, K U. (2005). "Association between ovariectomy and feline mammary carcinoma". *J Vet Intern Med.* 19, (4), pp.560-3.
- Plumb, C D. (2008). *Plumb's veterinary drug handbook*. 6th ed. St. Paul: Blackwell.
- Potter, K.; Hancock, D H.; Gallina, A M. (1991). "Clinical and pathologic features of endometrial hyperplasia, pyometra, and endometritis in cats: 79 cases (1980-1985)". *J Am Vet Med Assoc.* (8), pp.1427-31.
- Pukay, B P. (1979). "A hyperglycemia-glucosuria syndrome in cats following megestrol acetate therapy". *Can Vet J.* 20, (4), pp.117.
- Robbins, S C.; Jelinski, M D.; Stotish, R L. (2004). "Assessment of the immunological and biological efficacy of two different doses of a recombinant GnRH vaccine in domestic male and female cats (*Felis catus*)". *J Reprod Immunol.*, 64, pp.107-19.
- Romagnoli, S.; Concannon, P W. (2003). "Clinical use of progestins in bitches and queens: a review". www.ivis.org.
- Tamada, H.; Kawate, N.; Inaba, T.; Sawada, T. (2003). "Long-term prevention of estrus in the bitch and queen using chlormadinone acetate". *Can Vet J.* 44, (5), pp.416-7.
- Van Haaften, B. (1989). "Pyometra in an ovariectomized cat following treatment with proligestone". *Tijdschr Diergeneeskde*, 114, (7), PP.383-7.

CAPÍTULO 26

Interrupción de la gestación en la perra

María Cecilia Stornelli

Introducción

La ocurrencia de gestaciones no deseadas es frecuente en hembras caninas, y reviste un problema serio tanto para los propietarios de mascotas como para los propietarios de hembras destinadas a la reproducción. En algunas ocasiones los propietarios de mascotas prefieren implementar la terminación de la gestación con terapia médica antes que afrontar la cirugía y el post operatorio. Es así que la interrupción de la gestación constituye un motivo de consulta cotidiano en la clínica reproductiva diaria.

Cuándo se decide implementar una terapia para interrumpir la gestación en la hembra canina, debemos realizar un certero diagnóstico de gestación ya que aproximadamente el 62% de la perras llevadas a consulta a causa de un servicio no deseado, no están preñadas (Bruce, 2002). La perra requiere un cuerpo lúteo funcional que produzca progesterona suficiente para mantener la gestación, por lo tanto la utilización de drogas luteolíticas con la consecuente declinación de la progesterona sérica puede ser implementada para interrumpir la gestación. Es bien conocido que la hembra canina requiere de la fuente ovárica de progesterona para mantener la gestación, por lo tanto la luteólisis provoca el descenso de la progesterona sérica, y cuando la misma cae por debajo de 2 ng/ml durante 24h ocurre el aborto (Feldman y col., 1993). Así mismo el bloqueo de receptores uterinos de progesterona producirá el mismo efecto.

El tratamiento implementado para la ocurrencia del aborto debe ser de alta eficacia, no poseer efectos adversos y no debe afectar la fertilidad posterior de la hembra en ciclos futuros.

La interrupción de la gestación en la perra doméstica puede realizarse mediante diversas estrategias terapéuticas que comprenden agonistas dopaminérgicos, prostaglandinas (PG), combinación de agonistas dopaminérgicos con PG y antiprogestágenos. Así mismo la gestación puede prevenirse evitando la implantación mediante estrógenos y Tamoxifeno

Posibilidades terapéuticas

Estrógeno

En el pasado los estrógenos han sido usados como abortivos, administrándose luego de la observación de un servicio no deseado. Después de la ovulación los ovocitos fecundados permanecen en las trompas uterinas entre uno y tres días después del comienzo de diestro citológico. En este momento son susceptibles a los efectos de los estrógenos, su administración causa degeneración del cigoto y anormalidades en la implantación. Los compuestos estrogénicos habitualmente utilizados incluyen: cypionato de estradiol, dietilestrol y benzoato de estradiol (Bruce, 2002). El compuesto estrogénico más efectivo para evitar la gestación es el cypionato de estradiol (Johnston y col., 2001).

En la actualidad los compuestos estrogénicos para inducir aborto han caído en desuso y su implementación puede considerarse mala praxis debido a los efectos adversos asociados a estas drogas.

El efecto adverso de mayor relevancia es la aplasia medular, que puede llevar a la muerte. Otros efectos adversos que comprometen la salud del animal son hiperplasia endometrial quística/piómetra ya que los estrógenos aumentan los efectos de progesterona sobre el útero.

Tamoxifeno

Este compuesto, es otra opción terapéutica para implementar inmediatamente después del servicio. Si bien tamoxifeno es considerado un antiestrógeno, en perros este compuesto posee actividad estrogénica y actúa como contraceptivo y abortivo. Altera el tránsito del cigoto a través de las trompas uterinas e impide la implantación (Johnston y col., 2001). Se comunicó una eficacia del 100% para evitar la gestación cuando el fármaco fue administrado antes del día 15 del diestro, sin embargo cuando fue administrado luego de este período el tratamiento no fue efectivo. Los efectos colaterales incluyen, piómetra, endometritis y quistes ováricos. Debido a la pobre eficacia y a la ocurrencia de efectos colaterales adversos tamoxifeno ha sido escasamente utilizado en perros (Bruce, 2002).

Agonistas dopaminérgicos

Los agonistas dopaminérgicos inhiben la secreción de prolactina (PRL) al unirse a receptores dopaminérgicos a nivel de la hipófisis. PRL es el principal factor luteotrófico, por tal motivo el CL se vuelve incapaz de mantener la preñez luego del día 21 sin el soporte de esta hormona, debido a que se produce un descenso de la P_4 sérica (Johnston y col., 2001; Romagnoli, 2006). Es así que si la P_4 sérica desciende por debajo de 2ng/ml por un periodo de 24h ocurrirá el aborto (Bruce, 2002).

Los agonistas dopaminérgicos como Cabergolina y Bromocriptina poseen gran afinidad por los receptores dopaminérgicos (D2) y por lo tanto reducen la secreción de prolactina y disminuyen la concentración de progesterona sérica. Cabergolina posee un clearance lento, larga vida media y su acción es más específica sobre los receptores D2, por lo tanto posee escasos efectos colaterales indeseables. Bromocriptina posee vida media más corta por lo que debe administrarse dos veces por día y su acción es menos específica sobre los receptores D2, por lo tanto posee más efectos indeseables (efectos cardiorrespiratorios, hipotensión debido a vasodilatación y emesis por estimulación de quimiorreceptores de la zona gatillo (Romagnoli, 2006). Las dosis y frecuencia de administración más utilizadas para estas drogas por los diferentes autores es para Cabergolina 10 ug/kg cada 24 hs y de Bromocriptina 10-20 ug/kg cada 12 hs.

Prostaglandinas

Diversos autores han demostrado los efectos luteolíticos de las prostaglandinas en la perra, es importante remarcar que a diferencia de lo que ocurre en otras especies como los bovinos y equinos, una dosis simple de prostaglandinas no provocará luteólisis en la perra, sino que se requerirán múltiples dosis durante varios días para que la misma ocurra. Los efectos colaterales observados aproximadamente 20 minutos después de la administración de prostaglandinas se relacionan con la estimulación del músculo liso e incluyen vómitos, diarrea, temblores y jadeo. Cuando se implementan dosis altas puede ocurrir colapso circulatorio.

En la actualidad las prostaglandinas ($PGF_{2\alpha}$) naturales han caído en desuso debido a la severidad de los efectos colaterales y a que no se encuentran en el mercado.

Las prostaglandinas sintéticas presentan mayor afinidad por los receptores así como vida media más larga que las prostaglandinas naturales. Por otra parte las prostaglandinas sintéticas poseen menos efectos sobre el músculo liso, lo que redundará en menos efectos colaterales indeseables. Los análogos de prostaglandinas utilizados en caninos para la interrupción de la gestación incluyen, fluprostenol, cloprostenol, α prostol, fluprostenol, misoprostol.

Estos fármacos han sido utilizados solos o en combinación con inhibidores de las prostaglandinas como cabergolina y bromocriptina.

En la perra el análogo de prostaglandinas, cloprostenol, fue el compuesto más utilizado y con el que se lograron los mejores resultados (Bruce, 2002).

Cloprostenol se usó a dosis de 2,5 µg/kg tres aplicaciones con intervalos de 48h, a partir del día 30 de gestación. Un estudio demostró un 100% de eficacia cuando se implementó este protocolo. Los efectos colaterales disminuyeron cuando se administró anticolinérgicos como atropina, antes de la administración de prostaglandinas sintéticas (Romagnoli, 2006).

Tratamientos combinados

Diversos protocolos en los que se han combinado prostaglandinas sintéticas y agonistas dopaminérgicos han sido implementados con el objetivo lograr un efecto sinérgico entre estas drogas disminuyendo así las dosis de prostaglandina y en consecuencia los efectos colaterales indeseables. Cuando se administró cloprostenol y cabergolina durante la gestación media, se logró el aborto en el 100% de las perras tratadas (Oncin y col., 1996).

Los tratamientos implementados 28 días después del pico preovulatorio de LH, incluyeron:

- Cabergolina (5ug/kg,vía oral) una vez al día durante diez días, combinada con 2,5 ug/kg de cloprostenol vía subcutánea al comienzo del tratamiento.
- Cabergolina (5ug/kg, vía oral) una vez al día durante diez días, combinada con 1 ug/kg de cloprostenol vía subcutánea los días 28 y 32 después del pico preovulatorio de LH.
- Bromocriptina (30 ug/kg vía oral) tres veces al día durante tres días combinada con una única dosis de cloprostenol de 2,5ug/kg.
- Bromocriptina (30 ug/kg vía oral) tres veces al día durante tres días combinada con dos dosis de cloprostenol de 1ug/kg.

Con estos tratamientos se logró la reabsorción fetal sin expulsión de fetos en todas las perras tratadas, en algunas hembras se observó descarga sanguinolenta durante 4-21 días después del tratamiento. Por otra parte todas las perras tratadas quedaron preñadas en los ciclos posteriores al tratamiento. Los efectos indeseables relacionados con el efecto de las prostaglandinas fueron escasos (Bruce, 2002).

Antiprogestágenos

Los antiprogestágenos, como el aglepristone y mifepristone son antagonistas competitivos con gran afinidad por los receptores de progesterona (Hoffman and Shuler, 2000; Kaya, 2014).

Estos esteroides sintéticos, compiten por los receptores y desplazan a la progesterona endógena (Kanca, 2008). Solo aglepristone está disponible para ser usado en medicina veterinaria y ha sido evaluado en numerosos estudios científicos que demuestran su eficacia y ausencia de efectos colaterales indeseables. Aglepristone induce el aborto principalmente por su acción sobre el útero, al competir y desplazar a la progesterona suprimiendo su efecto biológico.

Aglepristone ha sido usado solo o en combinación con prostaglandinas sintéticas. Diversos investigadores comunican mejores resultados para inducir aborto cuando se implementan protocolos combinados (Fieni, 1996, Kaya, 2014).

Aglepristone es utilizado a dosis de 10mg/kg vía subcutánea, una vez al día en dos días consecutivos, solo o combinado con cloprostenol (1ug/kg, una vez al día, dos días consecutivos) (Kaya, 2014).

Isoquinolonas

Estas drogas son embriotóxicas y se utilizan en una sola administración por vía subcutánea. Han sido administradas en la gestación temprana siendo la droga más utilizada lotrifen (Lerner, 1989).

Bibliografía

- Bruce, E E. (2002). "Pregnancy termination in the bitch and queen". *Clinical techniques in small animal practice*, 17 (3), pp. 116-123.
- Feldman, E C., Davidson, A P., Nelson, E W et al. (1993). "Prostaglandin induction of abortion in pregnant bitches after misalliance". *J Amer Vet. Med.Assn.*, 202, pp. 1855-1858.
- Johnston, S D., Kuztritz, M V R., Olson, P. (2001). "Clinical Approach to infertility in the bitch". "In" ed Johnston, S D., Kuztritz, M V R., Olson, P. *Canine and feline Theriogenology*. (pp. 262-264). Ed. Philadelphia: WB Saunders.
- Hoffmann, B., Schuler, G. (2000). "Receptor blockers-general aspects with respect to their use in domestic animal reproduction". *Anim. Reprod.Sci.*, 60, pp. 295–312.
- Kanca, H., Walters, I., Scha fer-Somi, S., Budik, S., Ay S S., Kucukaslan, I., Agaoglu, A., Izgur, H., Aslan, S. (2008). "Induction of abortion with aglepristone significantly changed the expression and estrogen receptors in canine endometrial stromal cells". *Theriogenolog.*, 70, pp.1439–1448.
- Kayaa, D.; Küc ükaslanb I.; Agao gluc, A R.; Ayd. SS.; Schäfer-Somie, S.; Emref, B.; Balg, Y.; Einspanierh, A.; Gürcani, I S.; Gültikend, N.; Aslang, S. (2014). "The effects of aglepristone alone and in combination with cloprostenol on hormonal values during termination of mid-term pregnancy in bitches". *Animal Reproduction Scienc*, 146, pp. 210–217.
- Lerner, L J. (1989). "Development of novel embriotoxic compounds for interceptive fertility control in the dog". *J Reprod Fertil.*, 39, pp. 251-265.
- Romagnoli, S. (2006). "Control of reproduction in dogs and cats: use and misuse of hormones". *Proccedings World congress WSAVA/FECAVA/CSAVA*. P701-706.
- Onclin, K.; Verstegen, J P. (1996). "Practical use of a combination of a dopamine agonist and a synthetic prostaglandin analogue to terminate unwanted pregnancy in dogs". *J Small Anim.*, 37, pp. 211-216.

CAPÍTULO 27

Inducción de ciclos estrales en la perra

María Cecilia Stornelli

Introducción

El aumento del valor y las posibilidades de comercialización de los cachorros de pura raza, así como la creciente importancia de la cría canina tanto desde el punto de vista económico, recreativo o para la obtención de perros de trabajo ha impulsado el estudio y desarrollo de diversos métodos orientados al manejo del ciclo estral de la perra. En concordancia con estos hechos, una práctica en continuo estudio y desarrollo es la inducción de ciclos fértiles que hagan posible el nacimiento de cachorros en relación a las necesidades del criador. También, la inducción de ciclos estrales puede implementarse en aquellas perras con diagnóstico de intervalos interestrales prolongados no relacionados con enfermedad subyacente que pueda considerarse la causa de los mismos. La mayoría de los protocolos utilizados fueron evaluados en perras normales, por esto al implementarse en hembras con problemas subyacentes que afecten el normal funcionamiento del eje hipotálamo-pituitaria-ovario los resultados son pobres.

La inducción de ciclos y la reducción del intervalo interestro pueden realizarse en la perra mediante cuatro alternativas (Concannon y Vestergren, 1997). La primera alternativa incluye la utilización de una combinación de gonadotrofinas con o sin DES (eCG y hCG o hMG), gonadotrofinas de la pituitaria (FSH y LH) o DES y FSH. La segunda alternativa incluye la

utilización de GnRH y sus agonistas (buserelina y cistorelina) o superagonistas (nafarelina, lutrelina), para estimular la liberación de hormonas gonadotrópicas endógenas de la hipófisis. La tercera alternativa incluye la utilización de prostaglandinas para inducir luteólisis y acortar el diestro. La cuarta y última alternativa incluye la terminación del anestro mediante la utilización de los agonistas dopaminérgicos (bromocriptina, cabergolina, metergolina) que actúan inhibiendo la PRL y acortando así los períodos interestrales (Johnston y col., 2001).

Posibilidades terapéuticas

Gonadotrofinas

Las gonadotrofinas disponibles comercialmente y utilizadas en perros son la FSH, la eCG, la LH porcina, la hCG y la hMG (de la Sota y col., 2002).

Los métodos de inducción utilizando gonadotrofinas exógenas comprenden: 1) administración seriada de FSH o eCG para inducir el desarrollo de los folículos y el proestro, 2) administración seriada de FSH o eCG para inducir el desarrollo folicular seguida de la administración de LH o hCG para provocar la ovulación de los folículos desarrollados, 3) protocolos similares a los descritos en el punto 1 y 2 precedidos por tratamientos con estrógenos para lograr la sensibilización estrogénica del eje hipofisis/ovario, 4) LH porcina purificada, y 5) hMG (de la Sota y col., 2002).

En la perra se ha estudiado la eficacia de varios protocolos combinando eCG y hCG habiéndose observado diferentes resultados. La eCG se utilizó con dosis de 20 UI/kg/d vía IM o SC durante 5 o 10 d o con una dosis de 44UI/kg/d durante 9 d. En ambos casos la inducción de la ovulación se obtuvo con una dosis IM o SC de 500 UI de hCG (Stornelli, 2006; Stornelli, 2012). En líneas generales y como conclusión de la revisión de diversos trabajos, cuanto menos fueron los días de administración de la eCG, mayor fue el porcentaje de preñez (i.e. 5 d, 50-56% vs. 9-10 d 9-35%; Stornelli 2006, Stornelli, 2012). De hecho, se ha comunicado trombocitopenia debido a hiperestrogenismo en el 29% de las perras tratadas con una dosis de 20 UI/kg/d durante 10 d (Arnold y col., 1989).

Stornelli y col, comunicaron que la totalidad de las perras evaluadas en su estudio respondieron manifestando estro cuando se utilizaron 50 UI/Kg de eCG IM en una sola administración, siete días después se utilizó 500 UI vía IM de hCG para inducir ovulación lográndose 80% de preñez sin que se observen efectos adversos. Los protocolos que utilizan FSH como estímulo foliculotrópico tienen menos éxito en el logro de inducción de ovulación y gestación que los que utilizan eCG (Shille y col., 1984). Sin embargo, la utilización de inyecciones seriadas de FSH o LH después de un régimen de preparación con estrógenos usando DES ha tenido éxito en la inducción del estro y ovulaciones fértiles. Cuando se utilizó

DES a dosis de 5 mg diarios durante 5 a 7 d para producir signos de proestro y luego se administró 5mg de LH vía intramuscular el d 5 después del comienzo del proestro o 10 mg de FSH por vía intramuscular los días 9 y 11 a partir del primer día del proestro, todas las perras quedaron preñadas (Moses y Shille, 1988). En un estudio en el que se sustituyó LH por hCG la fertilidad y la incidencia de comportamiento estral no fueron tan exitosos (Shille y col., 1989).

Otros métodos de inducción implican la administración de GnRH exógena o agonistas de GnRH para producir la liberación de gonadotrofinas endógenas desde la hipófisis, crecimiento folicular y estro. La ovulación en estos casos ocurre como resultado del pico endógeno de gonadotrofinas, el crecimiento folicular y secreción de estrógenos. Sin embargo no se disponen de datos sobre la administración de LH o hCG para facilitar la ovulación de los folículos inducidos.

Agonistas de GnRH

Los agonistas de GnRH, son péptidos semejantes a GnRH, pero con modificaciones en los sitios de degradación enzimática; esto aumenta su resistencia a las peptidasas e incrementa la afinidad de unión al receptor. De esta manera los agonistas de GnRH poseen una mayor vida media en circulación. Los agonistas GnRH inducen inicialmente un incremento sustancial en las concentraciones de LH y FSH, pero la exposición continua frena la secreción de LH como respuesta a una falta de regulación de los receptores GnRH en las células gonadotropas (Herbert y col., 2005).

Los protocolos descriptos incluyen 1) administración endovenosa pulsátil de GnRH cada 90 min durante 6 o 12 d (Vanderlip y Wing, 1987), 2) goteo subcutáneo constante de un agonista de la GnRH durante 14 d (Concannon, 1989) y 3) administración por vía subcutánea de un agonista de GnRH 3 veces por d durante 14 d (Cain y col., 1988). 4) Utilización de implantes subcutáneos (en matriz biodegradables o silastic sólido) de agonistas GnRH, en este caso se documentó la inducción del estro entre 4y 8 días postimplante, cuando se utilizó deslorelina (Trigg y col., 2001), el implante debe ser removido el primer día del proestro para evitar la ocurrencia de efectos negativos sobre el desarrollo folicular debidos a la regulación decreciente que ocasionaría el agonista GnRH. Se han utilizado implantes con 1,05 mg, 2,10 mg y 4,70 mg de deslorelina y varios investigadores coinciden en sus resultados y comunican altas tasas de inducción de ciclos y preñez (Fontaine y col., 2011; Kutzler, 2010; Volkman y col., 2006), mientras que Walter y col. (2011), obtuvieron altas tasas de inducción de ciclos, pero el número de ovocitos y embriones fueron menores que los obtenidos por otros investigadores.

En perras en anestro, la administración de GnRH en forma pulsátil utilizando 40 a 400 ng/kg cada 90 min produjo la aparición de proestro en 3 a 6 d seguido de estro y ovulación en 2 semanas con tasas de fertilidad del 37% al 85% (Vanderlip y col., 1987; Cain y col., 1988). Sin embargo el costo que insume la utilización de bombas de infusión, lo hace poco práctico para

su uso rutinario. El goteo subcutáneo también indujo proestro y estro, con tasas de fertilidad del 25% si se lo administraba después del final de la lactación y del 50% si se administraba durante el anestro después de ciclos sin gestación (Concannon, 1989). Concannon utilizó lutrelina mediante bomba de infusión subcutánea y obtuvo mejores resultados con bajas dosis, posiblemente porque con dosis mayores ocurría una regulación negativa del eje hipotálamo hipofisario gonadal (Concannon, 2006). Este método también carece de practicidad ya que la implantación y extracción subcutánea de las bombas de infusión osmóticas requieren una cirugía menor. La administración subcutánea de un agonista de GnRH (DTrp-6 GnRH), a dosis de 1 ng/kg cada 8 h, durante 3 d, dio lugar a estro entre los 9 y 11 d en el 80% de las perras, quedando todas preñadas. A pesar del inconveniente de las tres inyecciones diarias este protocolo parece presentar la mejor combinación de eficacia y utilidad clínica en la utilización de GnRH (Cain y col., 1988; Concannon 1989; Vanderlip y col., 1987).

Agonistas dopaminérgicos

Los agonistas dopaminérgicos como la bromocriptina y cabergolina, han sido también utilizados con éxito para la inducción de ciclos estrales. La dopamina inhibe la liberación de PRL desde la pituitaria anterior; concomitantemente el tratamiento con inhibidores de la PRL disminuye el intervalo interestral e induce el estro en perras con anestro prolongado.

Si los agonistas dopaminérgicos son utilizados durante la fase lútea, el acortamiento del intervalo interestral se debe a un acortamiento de la fase lútea como resultado de la supresión en la secreción de PRL, el principal factor luteotrófico en la perra (Okkens y Kooistra, 2006).

Si bien anteriormente se creía que la inducción de ciclos estrales en la hembra canina, por agonistas dopaminérgicos se debía a la supresión en la secreción de PRL, debido a que está comprobado que elevadas concentraciones de esta hormona inhiben la liberación de LH, en la actualidad la mayoría de los investigadores coinciden que no es este el mecanismo, y que la inducción de ciclos se debe a otras acciones aún no bien comprendidas (Okkens y Kooistra, 2006). En condiciones fisiológicas, la concentración de PRL plasmática se mantiene baja durante el anestro y no se han evidenciado fluctuaciones en la transición entre el anestro y la fase folicular (Okkens y Kooistra, 2006).

La administración de agonistas dopaminérgicos a perras en anestro, no solo disminuye la concentración de PRL sérica, sino que también induce desarrollo folicular y estros fértiles probablemente por el incremento en la secreción de gonadotrofinas y de la respuesta ovárica a las mismas. Estos efectos se correlacionan con un incremento en la FSH plasmática pero no en la LH (Cirit y col., 2007; de Rensis y col., 2006). Diversos autores coinciden en que la PRL por sí sola no posee un rol predominante en el control de la foliculogénesis en la perra o sobre la transición del anestro al proestro (Spatini y col., 2007).

Los agonistas dopaminérgicos han sido utilizados satisfactoriamente en muchas perras, pero este método de inducción de estro puede requerir más de treinta días de tratamiento, dependiendo del estadio del anestro (temprano o tardío) en el que se encuentra la perra (Vestergren y col., 1999).

La bromocriptina está disponible comercialmente para la utilización en humanos y se ha utilizado en dosis de 20 a 250 ug/kg observándose una incidencia de aparición de signos de estro y tasas de preñez del 71 al 100% y 100% respectivamente. Pueden ser necesarios tratamientos de 1 a 3 meses antes de observar los signos de proestro. Rara vez se observan efectos secundarios importantes pudiendo aparecer vómitos cuando se utilizan dosis altas (Okkens, 1985; Zoldag y col., 2001). La cabergolina es el agonista dopaminérgico con el que se obtuvieron los mejores resultados, posee una alta afinidad por los receptores dopaminérgicos D2, baja afinidad por los receptores serotoninérgicos y acción de larga duración (de Rensis y col., 2006). Está disponible para su utilización en medicina veterinaria y utilizado a dosis de 5 ug/kg se lograron tasas de preñez del 83 a 93% (Kooistra y col., 1999). Sin embargo es importante destacar que el tiempo transcurrido entre la realización del tratamiento y la ocurrencia del proestro post tratamiento es sumamente variable (entre 1 y 3 meses). Este hecho hace que no puedan utilizarse estas drogas para sincronizar los ciclos en las perras, de tal manera que las pariciones ocurran en la épocas de mayor demanda de cachorros. Así mismo el tiempo prolongado de administración se relaciona con el incremento del costo del tratamiento, la complicación de la administración diaria de la droga y el desaliento del propietario. Por otro lado el escaso número de animales con el que se realizan los ensayos hace difícil realizar una adecuada evaluación de los protocolos de inducción en la perra.

En resumen, los fármacos que más se han utilizado en los últimos años para inducir ciclos en la hembra canina comprenden agonistas GnRH, agonistas dopaminérgicos y en menor medida las gonadotrofinas exógenas. La mayoría de los autores ha comunicado muy buenos resultados al utilizar implantes de agonistas GnRH siendo el más utilizado deslorelina; sin embargo estos implantes no están disponibles en nuestro país. Si bien en Argentina se ha utilizado en gran medida y con buenos resultados a los agonistas dopaminérgicos para inducir ciclos fértiles, el período desde el inicio del tratamiento hasta el comienzo del proestro es muy variable y en muchas ocasiones prolongado (más de 40 d), esto eleva los costos del tratamiento e impide predecir la fecha del ciclo y su sincronización. Por otra parte los resultados obtenidos por Stornelli y col muestran que 50 IU/kg de eCG, combinada siete días después con 500 IU de hCG fueron efectivos para inducir un ciclo estral normal y fértil en perras, sin ocurrencia de efectos colaterales adversos. El ciclo inducido ocurrió alrededor de los 164 días posteriores al celo anterior obteniéndose una tasa de preñez del 80%. Así mismo se logró una reducción del intervalo interestral en promedio de 48 días.

Bibliografía

- Arnold, S.; Arnold, P.; Concannon, P W., Weilenmann, R., Hubler, M.; Casal, M., Dobeli Fairburn, A., Eggenberger, E., Rusch, P. (1989). "Effect of duration of PMSG treatment on induction of estrus, pregnancy rates, and the complications of hyperoestrogenism in dogs". *J Reprod Fertil.* 39, pp.115-122.
- Cain, J L., Cain, G R., Feldman, E C. (1988). "Use of pulsatile intravenous administration of gonadotropin-releasing hormone to induce fertile estrus in bitches". *Amer J Vet Res.*, 49, pp. 1993- 1996.
- Cirit, U., Bacinoglu, S., Cangul, I T., Horoz Kaya, K., Muzaffer Taska K. (2007). The effects of a low dose of cabergoline on induction of estrus and pregnancy rates in anestrus bitches. *Animal Reproduction Science*, 101, pp. 134–144.
- Concannon, P W. (1989). "Induction of fertile oestrus in anoestrous dogs by constant infusion of GnRH agonist". *J Rep Fert.*, 39, pp. 149-160.
- Concannon, P W. (2006). "Temple M, Montanez A.; Newton L. Effects of dose and duration of continuous GnRH-agonist treatment on induction of estrus in beagle dogs: Competing and concurrent up-regulation and down-regulation of LH release". *Theriogenology*, 66, pp.1488–1496.
- Concannon PW, Vestergren J. Estrus induction in dogs: Use of gonadotropin therapies and dopamine agonist. En Proceedings of the Annual Meeting of the Society for Theriogenology, Montreal September 17-20. Nashville, Society for Theriogenology. 1997, p. 245-247.
- De La Sota, R L., Soto, A T., Gobello, M C. (2002). "Farmacología del estro y del parto". "En": Botana Lopez LM, Landoni MF, Martin-Jimenez T. *Farmacología y Terapéutica Veterinaria*. (pp. 423-432). Buenos Aires: McGraw-Hill Interamericana.
- De Rensis, A G., Spattini, B R., Ballabio, C., Scaramuzzi, R J. (2006). "The effect of administering a dopamine agonist (Cabergoline) on follicular and luteal development during pro-estrus and estrus in the female greyhound". *Theriogenology*, 66, PP. 887–895.
- Fontaine, E., Mir, F., Vannier, F., Gérardin, A., Albouy, M., Navarro, C., Fontbonne A. (2011). "Induction of fertile oestrus in the bitch using Deslorelin, a GnRH agonist". *Theriogenology*. 76, pp. 1561-1566.
- Herbert, C A., Trigg, T E. (2005). "Applications of GnRH in the control and management of fertility in female animals". *Anim Reprod. Sci.*, 88, pp. 141-53.
- Johnston, S D., Kuztritz, M V R., Olson, P. (2001). "Clinical Approach to infertility in the bitch". "In" ed Johnston, S D., Kuztritz, M V R., Olson, P. *Canine and feline Theriogenology*. (pp. 262-264). Ed. Philadelphia: WB Saunders.
- Kooistra, H S., Okkens, A C., Bevers, M M., Popp-Snijders, C., van Haaften, B., Dieleman, S J., Schoemaker, J. (1999). "Bromocriptine –induced premature oestrus is associated with changes in the pulsatile secretion pattern of follicle-stimulating hormone in beagle bitches". *J Reprod Fertil.*, 117, pp. 387-393.

- Kutzler, M A. (2010). "Effect of estrus induction on pregnancy rates in domestic bitches and queens". *Clinical Theriogenology*, 2, pp. 191-207.
- Okkens, A C., Bevers, M M.; Dieleman, S J. (1985). "Shortening of the interestrous interval and the lifespan of the corpus luteum of the cyclic dog by bromocryptine treatment". *Vet Q* 7, pp. 173-175.
- Okkens, A C and Kooistra, H S. (2006). Anoestrus in the Dog: a Fascinating Story. *Reprod Dom Anim.*, 41, pp. 291–296.
- Romagnoli, S. (2006). "Control of reproduction in dogs and cats: use and misuse of hormones". Proceedings World congress WSAVA/FECAVA/CSAVA. P701-706
- Romagnoli, S.; Concannon, P W. (2003). "Clinical use of progestins in bitches and queens: a review". www.ivis.org.
- Shille, V M. (1984). "Thatcher MJ, Simmons KJ. Efforts to induce estrus in the bitch, using pituitary gonadotropins". *JAVMA* 184, pp. 1469-1473.
- Shille VM, Thatcher MJ, Lloyd ML. Gonadotrophic control of follicular development and the use of exogenous gonadotrophins for induction of oestrus and ovulation in the bitch. *J Rep Fert* 1989; 39: 103-113.
- Stornelli, M C.; Gimenez, F.; Tittarelli, C M.; Savignone, C A.; de la Sota, L R.; Stornelli, M A. (2006). "Inducción de ciclos estrales en la perra: Actualización bibliográfica". *Analecta Veterinaria*, 26, (2), pp. 5-8.
- Stornelli, M C. (2012). Utilización combinada de eCG y hCG para inducer ciclos fertile en perras en anestro. Trabajo de tesis Doctoral.
- Trigg, T E.; Wright, P J.; Armour, A F.; Williamson, P E.; Junaidi, A.; Martin, G B.; Doyle, A G.; Walsh, J. (2001). "Use of a GnRH analogue implant to produce reversible long-term suppression of reproductive function in male and female domestic dogs. *J Reprod Fertil.*, 57, pp. 255-61.
- Vanderlip, S L.; Wing, A E.; Felt, P. (1987). "Ovulation induction in anestrus bitches by pulsatile administration of gonadotropin-releasin hormone". *Lab Anim Sci.*, 37, pp. 459-464.
- Verstegen, J.; Onclin, K.; Silva, L.; Concannon, P. (1999). "Effect of stage of anestrus on the induction of estrus by the dopamine agonist cabergoline in dogs". *Theriogenology*, 51, pp. 597–611.
- Volkman, D H.; Kutzler, M A.; Wheeler, R.; Krekeler, N. (2006). "The use of deslorelin implants for the synchronization of estrous in diestrus bitches". *Theriogenology*, pp 1497-1501.
- Walter, B.; Otdorff, C.; Brugger, N.; Braun, J. (2011). "Estrus induction in Beagle bitches with the GnRH-agonist implant containing 4.7 mg Deslorelin". *Theriogenology*. 75, pp. 1125-1129.
- Zoldag, L.; Fekete, S.; Csaky, I.; Bersenyi, A. (2001) "Fertile estrus induced in bitches by bromocryptine, a dopamine agonist: a clinical trial". *Theriogenology*, 55, pp.1657–66.

CAPÍTULO 28

Interrupción de la gestación en la gata

María Carla García Mitacek

Introducción

El control de la reproducción en la gata doméstica se presenta como un constante desafío en la clínica reproductiva de pequeños animales. Las gestaciones no deseadas son frecuentes en la gata doméstica durante la estación reproductiva. Muchas veces los propietarios de gatas mascotas concurren al veterinario con la sospecha de que su gata está preñada, en otras ocasiones no advierten los celos o no observan la cópula, por tal motivo muchas veces el veterinario descubre la preñez cuando se realiza un examen de rutina. Es así que la interrupción de la gestación constituye un motivo de consulta cotidiano en la clínica reproductiva diaria.

El nacimiento de gatitos no deseados determina la ocurrencia de poblaciones de gatos callejeros, lo cual constituye un problema de alto impacto económico-social en las zonas urbanizadas. La existencia de estas poblaciones aumenta las probabilidades de accidentes ocurridos con personas que toman contacto con animales callejeros sin controles sanitarios. El control de la reproducción de estos animales es imprescindible ya que las poblaciones de gatos callejeros crecen en forma exponencial con los consecuentes problemas que esto acarrea. La ocurrencia de enfermedades zoonóticas (toxoplasmosis, endo y exoparasitosis, clamidiasis, rabia, etc) y accidentes (mordeduras y arañazos) ocurridos con animales callejeros, deteriora la calidad de vida de toda la población y en especial la de los pobladores de zonas marginales.

Estos últimos son los que más problemas sanitarios padecen a consecuencia de la gran cantidad de animales callejeros sin controles sanitarios que habitan en dichas áreas. Así mismo, éstos animales sufren por falta de alimento, inclemencias del tiempo o enfermedades no tratadas.

Todos estos hechos hacen que la interrupción de la gestación en gatas sea un tópico de gran interés en medicina veterinaria. La implementación del protocolo utilizado para interrumpir la gestación dependerá del estadio de la preñez en que se encuentre la gata, de los efectos colaterales de las drogas utilizadas así como la disponibilidad de las mismas. Es así que un conocimiento acabado de la fisiología reproductiva de la gata (concepción y gestación) así como de las características farmacológicas de las drogas utilizadas (mecanismo de acción, efectos colaterales) permitirá implementar el protocolo adecuado para interrumpir la gestación en cada caso particular.

Interrupción de la gestación

Los estudios realizados han mostrado que la interrupción de la gestación en la gata doméstica puede realizarse mediante cuatro estrategias terapéuticas. La primera incluye la administración de agonistas dopaminérgicos, los cuales inhiben la secreción de prolactina al unirse a receptores dopaminérgicos a nivel de la hipófisis. La prolactina es el principal factor luteotrófico, por tal motivo el cuerpo lúteo se vuelve incapaz de mantener la preñez luego del día 21 sin el soporte de esta hormona, al producirse un descenso de la P_4 sérica (Johnston y col., 2001; Romagnoli, 2006). La segunda opción incluye el uso de prostaglandina (PG), la cual induce la lisis del cuerpo lúteo, estimula las contracciones uterinas y genera la dilatación cervical (Johnston y col., 2001; Romagnoli, 2006). Por tal motivo la administración seriada de PG natural o sintética en la segunda mitad de la gestación produce un descenso de la concentración de P_4 plasmática por lo que provoca el aborto con expulsión de los fetos (Felman y Nelson, 1991). La tercera opción se basa en la combinación de agonistas dopaminérgicos y PG cuya finalidad es reducir la dosis y por lo tanto disminuir los efectos colaterales de ésta última (Wanke y col., 2002). La cuarta opción incluye los antiprogéstágenos esteroides sintéticos que se unen a receptores de P_4 presentes en el útero, por lo cual interfieren con las acciones de la P_4 endógena, generando la interrupción de la gestación (Romagnoli, 2006).

Agonistas dopaminérgicos

La totalidad de los estudios realizados en los que utilizan agonistas dopaminérgicos para interrumpir la gestación en la gata se basan en la administración de cabergolina.

Verstegen logró interrumpir la gestación en el 80% de las gatas tratadas (4/5) cuando administró cabergolina (1.65 µg/kg/día), por vía subcutánea durante 5 días a partir del día 30 de gestación. El aborto se inició cuando los niveles séricos de P_4 descendieron a menos de 1 ng/ml. Esta disminución ocurrió entre el día 3 y 4 de tratamiento (Verstegen y col., 1993). En concordancia Erüna-Maral logró interrumpir la gestación en el 100% de los animales (8/8) entre el día 34 y 42 al administrarles cabergolina oral (15 µg/kg/día) durante 5.6 ± 1.5 días. En contraposición los dos animales de este estudio tratados entre el día 45 y 47 de preñez no interrumpieron la gestación manteniendo altos niveles de P_4 (16.9 y 9.8 nmol/l). Sin embargo las gatas parieron cachorros prematuros. Como efecto colateral se observaron vómitos en el 5.5% de las gatas tratadas. Solamente en cuatro de las gatas incluidas en este estudio no se vio afectada la fertilidad (Erüna-Maral y col., 2004).

Prostaglandinas

Los estudios realizados con prostaglandinas en gatas son controversiales. Los primeros estudios fueron realizados con prostaglandina PG natural ($PGF_{2\alpha}$). Más tarde se utilizó cloprostenol, una prostaglandina sintética que posee menos efectos colaterales que la PG natural. Sin embargo se necesitan aún más estudios para clarificar completamente la acción de la PG en los diferentes momentos de la gestación en felinos. Uno de los primeros estudios utilizó PG natural en una única dosis de 2 mg totales por vía intramuscular al día 33 de gestación, generando el aborto con la expulsión de fetos en la totalidad de las gatas tratadas (4/4). Se observó un descenso de la concentración de P_4 plasmática a las 24 h de iniciado el tratamiento. Dentro de los efectos colaterales pudo observarse la ocurrencia de náuseas, vómitos, diarrea y postración 10 minutos posteriores a la administración (Verstegen y col., 1993). En concordancia la administración de $PG F_{2\alpha}$ en una dosis de 500 a 1000 µg/kg durante 2 días consecutivos produjo aborto 48 h después de iniciado el tratamiento en gatas que presentaban más de 40 días de gestación. Por el contrario, en otro estudio, en aquellas gatas que presentaban menos de 40 días de gestación no ocurrió aborto (0/9) (Nachreiner y Marple, 1974; Bruce, 2002).

Baldwin obtuvo mejores resultados al utilizar $PGF_{2\alpha}$ a los 45 días de gestación (3/4) en comparación con los animales tratados al día 30 de gestación (1/4). Todos los animales recibieron la administración subcutánea de $PG F_{2\alpha}$ natural en una dosis de 200 µg/kg dos veces en el primer día de tratamiento, seguido de 500 µg/kg dos veces por día durante 5 días. Al abortar las gatas presentaron un nivel de P_4 sérico menor a 1.0 ng/mL (Bruce, 2002; Baldwin y col., 2000).

En trabajos realizados por García Mitacek y col., se administró cloprostenol, una prostaglandina sintética, en una dosis de 5 µg/kg/día/sc durante tres días consecutivos, en gatas durante la gestación temprana (21-22 días) y gestación media (35-38 días). En ninguna

de las hembras tratadas durante la gestación temprana (0/10) se produjo interrupción de la gestación, todas las gatas llegaron al final de la preñez, produciéndose el nacimiento de crías sanas, siendo el tamaño de camada de 3.7 ± 0.29 crías. Resultados similares se obtuvieron durante la gestación media, ya que sólo 1 (1/10) de las gatas tratadas abortó a los 5 días de iniciado el tratamiento. Las gatas restantes llegaron al final de la gestación, siendo el tamaño de camada de 3.44 ± 0.41 crías. Durante ambos protocolos pudo observarse que las concentraciones séricas de P_4 descendieron 1 día postadministración de la droga y comenzaron a ascender a los 4 días de iniciado el tratamiento. Sin embargo, durante todo el tratamiento la concentración de la hormona permaneció suficientemente alta como para mantener la gestación (García Mitacek y col., 2012; García Mitacek, 2013). Estos resultados podrían explicarse por la resistencia del cuerpo lúteo a la luteolisis durante el primer tercio de la gestación (Felman y Nelson, 1991). Así mismo, estudios recientes confirman que la placenta es capaz de sintetizar y secretar P_4 durante la gestación media y tardía. Por lo tanto, la fuente de P_4 placentaria sería capaz de mantener la gestación hasta el final de la misma (Verstegen y col., 1993; Siemieniuch y col., 2012). Los mencionados estudios explicarían la no ocurrencia del aborto con el uso de PG a los 35-38 días de gestación. Los animales tratados presentaron escasos efectos colaterales dentro de los cuales se observó vómito, diarrea, decaimiento, disminución de la ingesta de alimento, vocalizaciones y taquipnea entre 10 a 15 min luego de la administración de la droga (García Mitacek y col., 2012; García Mitacek, 2013).

Protocolos combinados de agonistas dopaminérgicos y prostaglandina

Algunos investigadores asociaron PG con agonistas dopaminérgicos con el fin de potenciar la acción de las drogas y disminuir la dosis de PG. Onclin administró una única dosis de 5 $\mu\text{g/kg}$ de cabergolina vía oral combinado con 5 $\mu\text{g/kg/día}$ de cloprostenol (PG sintética) durante 2 días por vía subcutánea en gatas que presentaban 30 días de gestación. La totalidad de las gatas abortaron a los 9 ± 1 día luego de la implementación del tratamiento. La concentración de P_4 plasmática fue decreciendo en forma rápida y constante generando la interrupción de la gestación. No se observaron efectos colaterales, excepto una descarga vulvar hemorrágica. Postratamiento, la fertilidad de las gatas no se vio afectada (Onclin y Verstegen, 1997). La asociación de agonistas dopaminérgicos y PG también fue utilizada por Erünał–Maral quien utilizó cabergolina 15 $\mu\text{g/kg/día}$ vía oral con alfaprostol 10 $\mu\text{g/kg/día}$ por medio, vía subcutánea. Las gatas fueron divididas en dos grupos. El primer grupo ($n=6$) fue tratado entre los 25 y 40 días de gestación, mientras que el segundo grupo ($n=2$) entre 45 y 47 días de gestación. Todas las gatas del primer grupo abortaron entre 6.2 ± 1.9 días de iniciado el tratamiento. Mientras que las gatas de segundo grupo parieron crías prematuras. Algunas gatas presentaron vómitos

como efecto colateral del tratamiento (Erüal-Maral y col., 2004). Si bien en ambos estudios se logra interrumpir la gestación media, en el segundo estudio no ocurre lo mismo durante la gestación tardía lo cual podría relacionarse con la producción placentaria de P₄ (Siemieniuch y col., 2012).

Antiprogestágenos

En los últimos años los antiprogestágenos han sido estudiados observándose buenos resultados. Goericke-Pesch administró aglepristone (10 mg/kg/día), por vía subcutánea durante 2 días consecutivos en gatas al día 5 y 6 postservicio. Se realizó un control ultrasonográfico a los 25 días postservicio en el cual se pudo corroborar que ninguna de las hembras tratadas (11/11) estaba preñada. Al realizar la medición de P₄ se pudo observar un incremento de los niveles postadministración de la droga relacionado con el bloqueo de los receptores de P₄ y el consecuente aumento de la P₄ circulante. Todas las gatas ciclaron y quedaron preñadas entre el primer y cuarto celo postratamiento. El tratamiento resultó efectivo para prevenir la gestación temprana, sin embargo no pudo diagnosticarse la ocurrencia de fecundación y desarrollo embrionario. Se postuló que el uso de aglepristone probablemente prevendría la nidación (Goericke-Pesch y col., 2010).

Si bien existen pocos trabajos sobre la interrupción de la gestación temprana en la gata doméstica, nuestro grupo de trabajo observó un 100% (10/10) de eficacia al administrar aglepristone (10 mg/kg/día) subcutáneo, durante dos días consecutivos. Se evidenciaron cambios a nivel de los sacos gestacionales a los 4.3 ± 0.6 días de iniciado el tratamiento, registrándose una reducción del volumen y diámetro medio de los sacos gestacionales de las gatas tratadas en comparación con las gatas que desarrollaban una gestación normal. En una gata se observaron tres sacos gestacionales, dos de ellos comenzaron a mostrar alteraciones ultrasonográficas a los 4 días de iniciado el tratamiento, pero una de ellas continuó con el desarrollo observándose un feto vivo hasta el día 42 de iniciado el tratamiento, momento en el cual se registró la muerte del mismo y posterior expulsión. Todas las hembras presentaron una leve descarga vulvar a los 7.42 ± 0.92 días de iniciado el tratamiento. Las concentraciones séricas de P₄ se incrementaron 1 día postadministración de la droga y comenzaron a descender a los 9 días de iniciado el tratamiento. Las gatas ciclaron nuevamente siendo el intervalo entre la interrupción de la gestación y el primer estro de 62.8 ± 8.6 días. Con la finalidad de evaluar la fertilidad posterior a la interrupción de la gestación, se pudo observar que la totalidad de las gatas tratadas quedaron preñadas en el primer servicio postratamiento, presentaron un desarrollo embrionario-fetal normal y parto eutócico. El promedio de crías nacidas por gata fue de 2.8 ± 0.31 . No se evidenciaron efectos colaterales en ninguno de los animales tratados (García Mitacek y col., 2012; García Mitacek, 2013).

Georgiev logró interrumpir la gestación en el 87% de las gatas tratadas (20/23) al administrarles aglepristone (10 mg/kg/día), por vía subcutánea durante 2 días consecutivos en gatas que presentaban 25 a 26 días de gestación. La concentración sérica de P_4 fue incrementándose desde el día 25 al 29 de gestación. No se observaron efectos colaterales en los animales tratados, solamente una gata presentó prurito en el sitio de inyección durante las 3 h posteriores a la administración (Georgiev y Wehrend, 2006). Estudios posteriores demostraron que la ocurrencia del aborto se relacionaba con la separación útero - placentaria generada por la destrucción de las vénulas, mientras que las arteriolas permanecieron intactas. Este genera una hemorragia intersticial, seguida por la extravasación al lumen uterino que se relaciona con descarga vulvar hemorrágica (Georgiev y Wehrend, 2008).

En concordancia Fieni obtuvo resultados similares al interrumpir la gestación del 88.5% de las gatas tratadas entre el día 29 y 37 días de gestación con aglepristone (15 mg/kg/día), por vía subcutánea durante dos días consecutivos. El 59.2 % de las gatas que abortaron presentaron una descarga vulvar hemorrágica. Las concentraciones séricas de P_4 aumentaron 60 h postadministración de la droga, mientras que 30 h postaborto se registró un descenso de la misma. Como efectos colaterales pudo observarse que un pequeño número de gatas presentó inflamación en el sitio de inyección. Mientras que 4 gatas manifestaron períodos de anorexia, depresión, agitación y diarrea en los primeros 7 días de iniciado el tratamiento. Luego del aborto todas las gatas retornaron al estro, y un 77% quedaron preñadas en el celo posterior al aborto y un 10% en el segundo celo (Fieni y col., 2006).

En un trabajo realizado por García Mitacek y col., se logró interrumpir la gestación en el 100% de los animales tratados (10/10) a los 35 a 38 días de gestación al administrarles aglepristone (10 mg/kg/día) subcutáneo, durante dos días, ocurriendo la expulsión de fetos 4.1 ± 0.31 días luego de iniciado el tratamiento. Las concentraciones séricas de P_4 se incrementaron 1 día postadministración de la droga y comenzaron a descender a los 5 días de iniciado el tratamiento. Todas las gatas presentaron descarga vulvar hemorrágica durante una semana postaborto y retornaron al estro 34.4 ± 5.84 días más tarde. El único efecto colateral observado fue el aumento de la vocalización en algunos animales. Estudios realizados con posterioridad demostraron que las gatas tratadas con el protocolo mencionado anteriormente conservan la fertilidad postaborto produciendo un promedio de 2.6 ± 0.22 crías nacidas por gata (García Mitacek y col., 2012; García Mitacek, 2013).

Georgiev administró aglepristone (10 mg/kg/día/sc) en el día 45 y 46 posterior al servicio. Cuatro de las 6 gatas tratadas abortaron entre 4-7 días de iniciado el tratamiento. Mientras que las 2 gatas restantes parieron crías a término. Se observó un incremento de la concentración sérica de P_4 al momento del aborto, y un posterior descenso alrededor del día 55. Todas las gatas retornaron al estro y quedaron preñadas. No se comunicaron efectos colaterales (Georgiev y col., 2010).

Conclusiones

Existen diferentes protocolos para la interrupción de la gestación en la gata doméstica, basándose en la administración de agonistas dopaminérgicos, prostaglandinas, combinación de agonistas dopaminérgicos y prostaglandinas o antiprogestágenos. Si bien existen varios trabajos sobre la interrupción de la gestación media, no ocurre lo mismo con la gestación temprana y tardía. La cabergolina, agonista dopaminérgico, administrada en gatas que presentan una gestación media ha permitido obtener muy buenos resultados, con la manifestación de mínimos efectos colaterales. Sin embargo, no ocurre lo mismo cuando esta droga es administrada durante la gestación tardía, ya que la misma ha producido el nacimiento de crías prematuras, por lo cual su uso no es recomendado luego de los 45 días de gestación. Es una droga de costo moderado y disponible en el mercado nacional, por lo cual podría ser una opción adecuada para aquellas gatas que presentan una gestación entre 30 a 40 días.

La mayoría de los trabajos han documentado la administración de PGF_{2α}, la cual resultó eficaz para interrumpir la gestación media, sin embargo las hembras manifiestan efectos colaterales moderados a graves como náuseas, vómitos, diarrea y postración. La administración de PG sintética no ha permitido interrumpir la gestación temprana y media, este efecto podría estar relacionado por la autonomía del cuerpo lúteo durante la gestación temprana, así como también la fuente de P₄ placentaria, la cual permitiría el mantenimiento de la gestación durante la gestación media y tardía.

Protocolos en los que se ha utilizado la combinación de cabergolina junto con prostaglandinas sintéticas como alfaprostol o cloprostenol, han logrado interrumpir la gestación media y reducir los efectos colaterales asociados a las prostaglandinas. En contraposición, la combinación de cabergolina con alfaprostol ha generado el nacimiento de crías prematuras cuando se administra durante la gestación tardía, por lo que no se aconseja su uso.

La administración de antiprogestágenos como el aglepristone utilizado para interrumpir la gestación media en la gata ha permitido obtener muy buenos resultados con la ocurrencia de mínimos efectos colaterales. Lo mismo puede observarse en la gestación temprana. Si bien solo existen dos trabajos en este estadio de la preñez, solo en uno de ellos se pudo diagnosticar la gestación y posterior interrupción de la misma; sin embargo su uso durante los primeros días postservicio sería eficaz para prevenir la gestación al afectar la nidación. Sin embargo la administración de aglerpistone durante la gestación tardía generó que algunas gatas parieran crías a término.

La realización de controles ultrasonográficos periódicos es de gran importancia para evaluar los cambios que ocurren a nivel de los embriones-fetos, ya que generalmente no se evidencian cambios externos visibles que permiten determinar la interrupción precoz de la gestación.

Finalmente protocolos farmacológicos que permitan interrumpir la gestación temprana, media o tardía con mínimos efectos colaterales para la hembra permitirán mejorar el control de la reproducción en felinos reduciendo las poblaciones de gatos callejeros.

Bibliografía

- Baldwin, C.; Evans, LE.; Peter, AT. (2000). "Evaluation of natural prostaglandin therapy for pregnancy termination in the domestic cat". *Feline Pract.* (28) pp. 16-21.
- Bruce, EE. (2002). Pregnancy Termination in the Bitch and Queen. *Clinical Techniques in Small Animal Practice.* 17 (3) pp.116-123.
- Erünel-Maral, N.; Aslan, S.; Findik, M.; Yüksel, N.; Handler, J.; Arbeiter, K.; (2004). "Induction of abortion in queens by administration of cabergoline (Galastop) solely or in combination with the PGF₂alpha analogue Alfaprostol (Gabbrostim)". *Theriogenology.* (61) pp. 1471-1475.
- Felman, EC.; Nelson, RH. (1991). "*Reproducción felina*". En: *Endocrinología y reproducción canina y felina.* (pp. 608-609). Buenos Aires. Intermedica.
- Fieni, F.; Martal, J.; Marnet, PG.; Siliart, B.; Guittot, F. (2006). "Clinical, biological and hormonal study of mid-pregnancy termination in cats with aglepristone". *Theriogenology.* (66) pp. 1721-1728.
- García Mitacek, MC.; Stornelli, MC.; Praderio, R.; Stornelli, MA.; de la Sota, RL. (2012). "Efficacy of use of cloprostenol or aglepristone at 21-22 and 35-38 days of gestation for pregnancy termination in queens". *Reprod Domest Anim.* 47 (6) pp. 200-203.
- García Mitacek, MC. (2013). Efecto de cloprostenol y aglepristone sobre la gestación temprana y media en felinos. Estudios clínicos, endocrinológicos y ultrasonográficos. Tesis Doctoral. FCV. UNLP.
- Georgiev, P.; Bostedt, H.; Goericke-Pesch, S.; Dimitrov, M.; Petkov, P.; Stojanthev K. (2010). "Induction of abortion with Aglepristone in cats on day 45 and 46 after mating". *Reprod Domest Anim.* 45(5) pp. 161-167.
- Georgiev, P.; Wehrend, A. (2008). "Histological changes of the feline cervix, endometrium and placenta after mid-gestational termination of pregnancy with aglepristone". *Reproduction in domestic animals.* 43 pp. 409-414.
- Georgiev, P.; Wehrend, A. (2006). "Mid-gestation pregnancy termination by the progesterone antagonist aglepristone in queens". *Theriogenology.* 65: pp. 1401-1406.
- Goericke-Pesch, S.; Georgiev, P.; Wehrend, A. (2010). "Prevention of pregnancy in cats using aglepristone on days 5 and 6 after mating". *Theriogenology.* (74) pp. 304-310.
- Johnston, SD.; Root Kustritz, M.; Olson, PNS. (2001). *Canine and feline theriogenology.* 1 Ed. (pp. 447-452). Philadelphia, London, New York, St. Louis, Sydney, Toronto: W.B. Saunders Company. 2001.
- Nachreiner, RF.; Marple, DN. (1974). "Termination of pregnancy in cats with prostaglandin F₂alpha". *Prostaglandins.* (7) pp. 303-308.
- Onclin, K.; Verstegen, J. (1997). "Termination of pregnancy in cats using a combination of cabergoline, a new dopamine agonist, and a synthetic PGF₂ alpha, cloprostenol". *J Reprod Fertil Suppl.* (51) pp. 259-263.

- Romagnoli S. (2006). "Control of reproduction in dogs and cats: use and misuse of hormones". IVIS website with the permission of WSAVA. pp.701-706.
- Siemieniuch, MJ.; Jursza, E.; Szostek, AZ.; Skarzynski, DJ.; Boos, A.; Kowalewski, MP. (2012). "Steroidogenic capacity of the placenta as a supplemental source of progesterone during pregnancy in domestic cats". *Reprod Biol Endocrinol.* pp. 10: 89.
- Verstegen, J.; Onclin, K.; Silva, LD.; Wouters-Ballman, P.; Delahaut, P.; Ectors, F. (1993). "Regulation of progesterone during pregnancy in the cat: studies on the roles of corpora lutea, placenta and prolactin secretion". *J Reprod Fertil Suppl.* (7) pp. 165–173.
- Verstegen, J.; Onclin, K.; Silva, LDM.; et al. (1993). "Induction of abortion in bitches and cats by cabergoline". *Ann Med Vet.* (137) pp. 251-259.
- Wanke, MM.; Romagnoli, S.; Verstegen, J.; Concannon, PW. (2002). "Pharmacological Approaches to Pregnancy Termination in Dogs and Cats Including the Use of Prostaglandins, Dopamine Agonists, and Dexamethasone". International Veterinary Information Service (www.ivis.org), Ithaca, New York, USA.

CAPÍTULO 29

Inducción de ciclos estrales en la gata

María Carla García Mitacek

Introducción

El estro en la gata puede ser inducido en forma medicamentosa o mediante el manejo artificial del fotoperíodo o régimen lumínico. Así mismo, la ovulación puede inducirse o favorecerse mediante protocolos farmacológicos. Existen comunicaciones que indican que la estimulación vaginal mediante una varilla de vidrio durante el estro en la gata ha permitido la ovulación (Johnston y col., 2001; Felman y Nelson, 1983).

La eCG ha sido utilizada para inducir el desarrollo folicular. Mientras que la hCG presenta actividad luteotrófica, la misma presenta fuerte afinidad por los receptores de LH y ha sido utilizado para inducir la ovulación durante el ciclo estral natural o en gatas tratadas con eCG (Swanson, y col., 1997).

Es importante recordar que en relación a la fisiología reproductiva de la gata la inducción del estro con el consecuente desarrollo folicular debe ser seguida de servicio natural para lograr ovulación y preñez. Si se decide usar inseminación artificial con semen fresco o criopreservado debe inducirse el desarrollo folicular y posteriormente la ovulación para lograr buenos resultados.

Protocolos farmacológicos utilizados

Se ha comunicado la administración de eCG en una única dosis (150 UI) en gatas durante el anestro, seguido de la administración de hCG en una dosis de 50 UI a los 5-7 días posteriores a la administración de la eCG. La utilización de este protocolo produjo la ovulación y porcentaje de preñez semejante al servicio natural. Sin embargo, se observó que las dosis repetidas de gonadotropinas exógenas pueden dar a lugar a la formación de anticuerpos contra eCG, lo que resultará en una reducción a la respuesta de la estimulación. Por lo tanto, no se recomienda repetir este tipo de tratamientos (Verstegen, 1998).

Swanson, y col., utilizaron diferentes dosis y vías de administración de eCG y hCG durante el anestro con la finalidad de inducir el estro y ovulación en las gatas. En dicho trabajo no se observaron diferencias en el número de folículos o cuerpos lúteos y concentraciones hormonales (17β estradiol, P_4) al realizar la administración por vía intravenosa o intramuscular. Así mismo, el número de folículos ováricos maduros a las 168 h postadministración de eCG o hCG, indicarían que ambas drogas son efectivas para inducir la maduración folicular. Además la hCG es capaz de promover la formación de folículos secundarios, lo cual generalmente es observado después de la ovulación en gatas tratadas con la combinación de eCG y hCG (Swanson, y col., 1997).

Otro grupo de drogas, los agonistas dopaminérgicos, han mostrado ser efectivos. La administración de un agonista dopaminérgico como la cabergolina, en una dosis diaria de 5 $\mu\text{g/kg}$, hasta la aparición de signos compatibles con el estro, ha permitido obtener muy buenos resultados sobre la inducción del estro en las gatas (Verstegen, 1998).

La hormona GnRH ha sido utilizada por algunos investigadores. Chakraborty y col., administraron 25 μg de GnRH intramuscular observando un incremento de la concentración sérica de LH y la ovulación en las gatas tratadas durante el estro o anestro (Chakraborty y col., 1979; Johnston y col., 2001). Resultados similares se obtuvieron al administrar GnRH en una dosis de 1 $\mu\text{g/kg}$ sc hasta la aparición de signología de celo o por un máximo de 10 días (Verstegen, 1998).

Variados protocolos han sido utilizados para inducir el estro durante el anestro y luego provocar la ovulación. Uno de ellos se basa en la administración diaria de 2 mg de FSH por vía im (durante 3-7 días) hasta el comienzo del estro. Seguida por servicios naturales o mediante la administración de 250 UI de gonadotropina coriónica humana (hCG) por vía im, con la finalidad de inducir la ovulación (Johnston y col., 2001; Felman y Nelson, 1983). Así mismo, la folículogénesis puede ser inducida mediante la administración de FSH urinaria humana o gonadotropina de mujer menopáusica (hMG) seguido de la administración de hCG. Se ha comunicado que el servicio natural (3 servicios diarios durante los primeros 3 días del estro) seguido de la administración de hCG (250 UI, im en los días 2 y 3 del estro), mejora la respuesta ovulatoria, ya sea durante el estro natural o inducido (Johnston y col., 2001). Sin

embargo, la ovulación sólo se produce si el intervalo entre estímulo de la FSH y LH excede las 88 h (Johnston y col., 2001).

Manejo del fotoperíodo

Por otro lado, la inducción del ciclo estral en la gata puede realizarse mediante el manejo lumínico, es decir a través de un incremento del fotoperíodo en forma artificial. Al incrementar el fotoperíodo a 24 h luz y 0 h oscuridad, se incrementa la folículo-genesis, se incrementa el peso ovárico, sin embargo, este manejo no resulta tan efectivo como la inducción de estros cuando las gatas son sometidas a 14 h luz y 10 h oscuridad (Gimenez y col., 2009, García Mitacek y col., 2012). Mientras que los fotoperíodos cortos (8 h luz y 16 h oscuridad) suprimen el ciclo estral (Johnston y col., 2001). Por lo tanto, si las gatas son sometidas a 14 o más horas de luz artificial presentan ciclos estrales comparables a los ocurridos durante la época del año en la que ocurren días largos (primavera-verano) en países con marcadas diferencias lumínicas entre las estaciones del año (Robledo y col., 2003; Giménez y col., 2006a). Así mismo se ha observado que los ciclos estrales ocurridos en gatas sometidas a 14 h de luz artificial son comparables en duración, manifestaciones conductuales, imagen citológica vaginal y concentración de E2 y P4 a los ciclos observados en gatas sometidas a un fotoperíodo largo (14 horas/luz) de luz natural. Algunas gatas presentaron ovulación espontánea y ocurrencia de pseudopreñez. Así mismo, las gatas servidas quedaron preñadas lo que muestra que los celos fueron fértiles (Giménez y col., 2006b, c, d; Giménez y col., 2007).

Bibliografía

- Chakraborty, PK.; Wildt, DE.; Seager, SW. (1979). "Serum luteinizing hormone and ovulatory response to luteinizing hormone-releasing hormone in the estrous and anestrus domestic cat". *Lab Anim Sci.* 29 (3) pp. 338-44.
- García Mitacek, MC.; Stornelli, MC.; Praderio, R.; Stornelli, MA.; de la Sota, RL. (2012). "Efficacy of use of cloprostenol or aglepristone at 21-22 and 35-38 days of gestation for pregnancy termination in queens". *Reprod Domest Anim.* 47 (6): pp. 200-203.
- Giménez, F.; Stornelli, MC.; Savignone, CA.; Tittarelli, CM.; de la Sota, RL.; Stornelli, MA. (2006a). "Reproductive physiology and contraception in queen". *Anal Vet.* (26) pp.38-43.
- Giménez, F.; Stornelli, MC.; Nuñez Favre, R.; Tittarelli, CM.; Savignone, CA.; de la Sota, RL.; Stornelli MA. (2006b). "Relación entre el momento del ciclo estral, citología vaginal y características microscópicas del mucus vaginal en la gata domestica (*Felis catus*)". Congreso Nacional de la Asociación de Veterinarios Especializados en Animales de Compañía de Argentina (AVEACA). Buenos Aires, Argentina. Actas Buenos Aires: AVEACA. pp.178.
- Giménez, F.; Stornelli, MC.; Tittarelli, CM.; Savignone, CA.; de la Sota, RL.; Stornelli, MA. (2006c). "Behavioral, vaginal cytology, endocrinology and fertility study in queens with oestrus induction by photoperiodic manipulation". Congreso de la Federación Ibero Americana de Asociaciones Veterinarias de Animales de Compañía (FIAVAC) y Congresso Brasileiro da Associação Nacional de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais (ANCLIVEPA), Vitória, ES, Brasil. Anais Vitória: ANCLIVEPA. pp.213.
- Gimenez, F.; Stornelli, MC.; Tittarelli, CM.; Savignone, CA.; Dorna, IV.; de la Sota, RL.; Stornelli, MA. (2009). "Suppression of estrus in cats with melatonin implants". *Theriogenology.* 72 (4) pp. 493-499.
- Giménez, F.; Stornelli, MC.; Tittarelli, CM.; Savignone, CA.; Sanchez Pereyra, N.; de la Sota, RL.; Stornelli, MA. (2007). "Prevención del estro en la gata doméstica mediante la aplicación de implantes de melatonina: 18 y 36 mg". Congreso de Medicina Veterinaria. La Habana, Cuba. Actas La Habana: [s.n.]. pp.103.
- Giménez, F.; Stornelli, MC.; Tittarelli, CM.; Savignone, CA.; Videla Dorna, I.; de la Sota, RL.; Stornelli, MA. (2006d). "Effect of melatonin implants on control of reproduction in the domestic cat (*Felis catus*)". *Theriogenology.* (66) pp.681-682.
- Robledo, MAM.; Carneiro, M.; Raratella-Evêncio, L.; Evêncio-Neto, J. (2003). "Avaliação do fotoperíodo na indução do estro em gatas domésticas". *Rev Bras Reprod Anim.* 27(2) pp. 274-275.
- Swanson, WF.; Wolfe, BA.; Brown, JL.; Martin-Jimenez, T.; Riviere, JE.; Roth, TL.; Wildt, DE. (1997). "Pharmacokinetics and ovarian-stimulatory effects of equine and human chorionic

gonadotropins administered singly and in combination in the domestic cat". Biol Reprod. 57(2) pp. 295-302.

Verstegen, JP. (1998). "Pharmacological control of reproduction in the cat". En: Simpson GM, England GCW, Harvey M, editores. Manual of small animal reproduction and neonatology. (pp. 219-226). United Kingdom, British Association.

PARTE VII:

Biotechnologías reproductivas especiales

Claudia Marcela Tittarelli



CAPÍTULO 30

Recuperación espermática epididimal como medio para preservar material genético

Claudia Marcela Tittarelli

Introducción

La recuperación espermática postmortem de espermatozoides epididimales (EE), es una técnica de gran valor que junto a la criopreservación permite, luego de la muerte repentina o la castración inevitable de los animales, conservar gametas y obtener reservas de material genético de especies valiosas, de interés para los zoológicos o en vías de extinción. La recuperación post-orquiectomía o post-mortem de gametas a partir de los órganos reproductivos y la posterior criopreservación de las mismas, permite crear bancos de reserva de material genético (Roldán, 2009).

El avance de la biotecnología ha demostrado que los conocimientos sobre recuperación y criopreservación de EE en especies domésticas pueden ser de suma importancia como modelo experimental para ser utilizados en animales silvestres en vías de extinción (Swanson, 2006). De esta manera aumentarían las posibilidades de preservación de material genético sumándose al esfuerzo mundial para evitar las pérdidas de especies en el planeta. (IUCN, 2008; Díaz y col, 2000).

La obtención de espermatozoides epididimales maduros potencialmente fértiles, almacenados en la cola del epidídimo, puede ser la única opción para preservar el material genético de un macho de alto valor reproductivo postmortem. Walton en 1930 fue el primero en

recuperar espermatozoides vivos de vasos deferentes de conejos. Posteriormente, se han realizado estudios sobre recuperación y criopreservación espermática epididimal en ratones (Sato y col, 2004), ciervos (Hishinuma y col, 2003), equinos (Bruemmer y col, 2002), ovinos (Kaabi y col, 2003), caninos y felinos (Baterman y col, 2000, Peña y col, 2000; Pushett y col, 2000; Stilley y col, 2000). Así mismo, se han realizado diversos estudios para determinar si los EE pueden ser usados para producir embriones viables y nacimiento de crías vivas. Se han comunicado fertilizaciones exitosas de ovocitos de ratón utilizando EE (Iwamatsu y col, 1971), obtención de fetos normales de ratones luego de FIV (fertilización in vitro) con EE refrigerados a 4°C después de la colección y nacimiento de crías vivas de ratas mediante el uso de EE (Fuller y col 1996) incluso con espermatozoides recuperados de epidídimos (EPI) de ratones congelados y descongelados (Songsasen y col, 1997). También en caprinos, lograron embriones hasta la etapa de blastocisto con EE mediante FIV y nacimiento de crías vivas por inseminación artificial (IA) (Song y col, 1988, Blash y col, 2000). En bovinos, Graff y col, 1996, obtuvieron preñeces implementando FIV realizada con EE y, Foote 2000, logró el nacimiento de crías vivas mediante IA de EE. En equinos, Barker y col, 1957 obtuvieron nacimientos de potrillos por IA con espermatozoides de EPI criopreservados y descongelados. Y en cebras, Meintjes y col, 1997, comunicaron el uso de EE en FIV logrando el desarrollo de embriones hasta la etapa de blastocito.

Se ha comprobado que la temperatura a la que se mantienen los órganos reproductivos (EPI) hasta la obtención de los EE, el tiempo desde la recolección de los órganos hasta recuperar las gametas y el medio utilizado en el transporte de los EPI afectan la calidad de las células recuperadas (Savignone y col, 2004, Tittarelli y col, 2006, Tittarelli y col, 2012a., Tittarelli, 2014). Es así que variables relacionadas con el manejo y el almacenado de epidídimos durante transporte de los testículos y EPI a un laboratorio de Andrología deben ser tenidas en cuenta para salvar las células reproductivas ante la muerte repentina de un animal.

Numerosos informes indican que la refrigeración del epidídimo a 4°C ó 5°C permite obtener mejor calidad de espermatozoides comparados con el almacenado de estos órganos a temperatura ambiente hecho que podría ser explicado por la disminución del metabolismo celular de los espermatozoides almacenados a 4°C o 5°C. La refrigeración evita un rápido descenso de la motilidad de los espermatozoides (Kishikawa y col, 1999; Salamon y col, 2000, Sankai y col, 2001, Hishinuma y col, 2003). Stilley y col, 2000 comprobaron en caninos que a temperatura ambiente (22°C) se produce autólisis de los tejidos a las 54 horas post-mortem y que la motilidad disminuye en los espermatozoides recuperados a las 24 horas (h). Además, observaron que cuando los EPI se almacenan refrigerados a 4°C se obtienen células espermáticas vivas hasta el séptimo día.

En porcinos y caninos se demostró que a medida que aumenta el tiempo de almacenado de los EPI a 4°C y la recuperación epididimal la cantidad de EE viables decrece al disminuir la motilidad de los espermatozoides almacenados (Kikuchi y col, 1998, Yu y col, 2002). Estudios realizados en caninos y felinos mostraron que todos los parámetros evaluados fueron

significativamente inferiores a las 72 h comparados con los resultados obtenidos al recuperar a las 24 h. sin embargo aún a las 72 h pos-castración pudieron obtenerse EE viables (Tittarelli y col, 2006; Tittarelli, 2014). Asimismo, Yu y Leibo, 2002 estudiaron el efecto sobre la motilidad, integridad de membrana plasmática y acrosomal de EE caninos refrigerados obteniendo aún después del almacenamiento durante 192 h (8 días) a 4°C, espermatozoides móviles que fueron capaces de unirse a zona pelúcida.

En felinos, Gañán y col, 2009, obtuvieron diferencias significativas en el vigor a las 24 h y en el porcentaje de espermatozoides móviles a las 72h de almacenado, sin embargo, el porcentaje de espermatozoides normales y el porcentaje de acrosomas intactos fueron similares en las muestras obtenidas dentro de las 2 h post-orquiectomía y luego del almacenado. Tittarelli y col, comprobaron en caninos luego de 24h de almacenado disminución de todos los parámetros estudiados a excepción de la prueba hiposmótica (HOS). Asimismo, en felinos, todas las variables disminuyeron significativamente a las 24 h salvo el porcentaje de acrosomas intactos y el vigor. Estos resultados coinciden con estudios histológicos y ultraestructurales sobre las células del epitelio epididimal de caninos y felinos en los cuales pudo observarse el avance del proceso de autólisis celular a medida que el tiempo de almacenado se prolongaba (Tittarelli y col, 2012a; Tittarelli y col, 2013; Tittarelli, 2014).

Por otra parte, el uso de diferentes medios de almacenado de los órganos como la solución fisiológica (SF) el MRA® o el tris yema de huevo (TYH) mostraron variaciones en los parámetros espermáticos obtenidos al recuperar espermatozoides de EPI almacenados a 4°C durante 24 h.

Trabajos realizados en chinchillas (Savignone y col, 2004) comunican mejores parámetros espermáticos almacenando los órganos en MRA® comparados con los almacenados en SF. Los espermatozoides recuperados de EPI almacenados en SF tuvieron menor motilidad, vigor y endósmosis positiva comparados con los almacenados en TYH o MRA®. Así mismo, los espermatozoides recuperados de EPI almacenados en TYH tuvieron mayor motilidad, vigor, endósmosis positiva y acrosomas intactos comparados con los recuperados de EPI almacenados en MRA®.

En caninos no se encontraron diferencias en la calidad de EE almacenados en SF y TYH (Tittarelli, 2006). En felinos, se observó mayor motilidad y vigor en los espermatozoides de epidídimos almacenados en TYH con respecto a los espermatozoides almacenados en SF (Tittarelli y col, 2006). Estas diferencias entre especies de la viabilidad espermática al almacenar los epidídimos en distintos medios podrían asociarse al diferente tamaño y espesor de la pared de los epidídimos de chinchillas, gatos y perros (Kitt y col, 1985). Si bien los EE son almacenados dentro del epidídimo, de manera que durante el refrigerado estarían protegidos del shock térmico directo (Sankai y col, 2001, Yu y col, 2002), la incorporación de un medio de almacenado mejoraría la protección de los espermatozoides al shock térmico. Trabajos en los que, a través de la colocación de termocuplas, se registraron las curvas de descenso de temperatura dentro de las colas epididimales de caninos y felinos almacenados en SF y TYH

mostraron diferencias en el descenso térmico dentro de los epidídimos de las diferentes especies. En estos estudios se observó una disminución térmica más rápida en los felinos. (Tittarelli y col, 2012b, Tittarelli CM, 2014).

El medio de almacenado actuaría previniendo la deshidratación del epidídimo mejorando la conservación del mismo, preservando de esta manera las características del medio interno del órgano lo cual resultaría en una mejor conservación de los EE (Sankai y col, 2001). La autólisis postmortem consecutiva a la hipoxia produce cambios en la permeabilidad selectiva de la membrana celular, por lo tanto, el mantenimiento de la integridad celular del epidídimo, almacén de las células espermáticas, permitiría recuperar mayor cantidad de espermatozoides viables. Los cambios autolíticos dentro del epidídimo podrían ser la razón de la reducción de la motilidad espermática durante el almacenado previo a la recuperación. (Gañán, 2009) Se han realizado estudios preliminares sobre epidídimos felinos y caninos almacenados durante 24 a 72h en dos medios [solución fisiológica (SF) y tris yema de huevo (TYH)]. Estos estudios mostraron que los epidídimos felinos almacenados presentaban cambios estructurales (Foto.1) y ultraestructurales (Foto 2) con el tiempo, aumentando los grados de cambios celulares con el incremento de las horas de almacenado (Tittarelli y col., 2008; Jurado y col, 2009; Tittarelli y col, 2012a).

Por otro lado, al comparar los medios de almacenado entre sí, no se observaron diferencias mediante el estudio por microscopía óptica, sin embargo, el estudio realizado mediante microscopía electrónica reveló que las muestras almacenadas en TYH presentaban alteraciones de menor cuantía en comparación con los epidídimos almacenados en SF. En estos últimos, los cambios más notorios se observaron en los núcleos de las células principales que mostraron contorno irregular con cromatina en grumos, mientras que en el citoplasma las organelas presentaron distintas alteraciones: retículo endoplasmático rugoso (RER) moderadamente dilatado, mitocondrias redondas hinchadas y un aparato de Golgi muy desarrollado. Además, se destacó la presencia de abundante cantidad de lisosomas muy grandes en muchas células. Las estereocilias se agruparon formando penachos. Los espacios intercelulares presentaron amplias dilataciones (Foto 3) (Tittarelli y col, 2012a).

Por otra parte, en los epidídimos almacenados en TYH durante 72 h, las alteraciones también fueron notables en las células principales aunque en menor cuantía que aquellos refrigerados en SF. Si bien los núcleos presentaron la cromatina agrupada en grumos y el aparato de Golgi ocupó un área extensa con sus cisternas ligeramente dilatadas, las mitocondrias no mostraron alteraciones. Predominó el RER laminar y la presencia de lisosomas fue moderada. Las estereocilias se observaron bien conservadas y se detectaron proyecciones citoplasmáticas y restos celulares en la luz tubular. Los espacios intercelulares no presentaron características distintivas. Las diferencias ultraestructurales observadas al comparar los medios de almacenado entre sí, podrían relacionarse con la capacidad del Tris yema de huevo para conservar mejor los epidídimos, preservando mejor el medio ambiente epididimal (Tittarelli, 2008; Jurado y col, 2009). Estos resultados concuerdan con los estudios previos que mostraron

mayor cantidad de espermatozoides felinos viables recuperados de epidídimos almacenados en TYH en comparación con los espermatozoides recuperados de epidídimos felinos almacenados en SF (Tittarelli y col, 2006).

Por otro lado, en cortes de EPI de caninos, el estudio microscópico (Foto.4) y ultramicroscópico (Foto.5) reveló cambios celulares con el tiempo pero no se manifestaron diferencias celulares entre los dos medios de almacenado.

Estos hallazgos también concuerdan con los estudios previos que no mostraron diferencias en la cantidad de espermatozoides viables recuperados de epidídimos almacenados en uno y otro medio (Tittarelli y col, 2006; Tittarelli y col, 2013). Estos trabajos muestran que el medio de almacenado (TYH) permitió preservar los tejidos epididimales y enlentecer la muerte celular (autólisis) lo que puede haber favorecido en forma indirecta la sobrevivencia de los espermatozoides dentro del EPI. Sin embargo, trabajos recientes comunican la ocurrencia de estacionalidad reproductiva en el gato doméstico como ocurre con otras especies de animales. Stornelli MA y col, 2009, encontraron una producción espermática basal en otoño-invierno y una producción espermática máxima en primavera-verano en relación a la cantidad de horas luz diaria. La influencia del fotoperíodo influiría también en la edad de alcance de la pubertad al igual que lo que ocurre en la hembra. Futuros estudios permitirán conocer la influencia de la estación del año y la edad de los animales sobre los hallazgos ultramicroscópicos. En relación al conocimiento de estos hechos podrá estimarse la influencia de las alteraciones ultraestructurales encontradas sobre la preservación espermática en relación al medio de almacenado.

Posteriormente a la recuperación de los EE es necesaria la criopreservación de los mismos para conservar las gametas en el tiempo, de allí la importancia de la realización de estudios sobre la criopreservación espermática epididimal. Los avances en los procesos de congelación permitirán optimizar los resultados obtenidos luego del descongelado de los EE.

Si bien la criopreservación de semen canino permite obtener espermatozoides de los reproductores con técnicas sencillas, ante eventos impredecibles, la obtención y criopreservación de EE recuperados de la cola del epidídimo maduros, mótils y con capacidad fecundante, nos permite preservar un buen material genético post-mortem (Yu y Leibo, 2002).

Los EE pueden ser almacenados por largo tiempo en bancos de semen, preservando el material genético. Debemos recordar que, para poder interactuar con el ovocito, los espermatozoides deben estar vivos, mótils y poseer las membranas plasmática y acrosomal intactas. Los procesos de criopreservación afectan la integridad acrosómica, el acrosoma debe estar intacto en el momento de la inseminación debido a que la reacción acrosómica debe ocurrir en el sitio donde ocurre la fertilización.

Estudios que permitan obtener mejores resultados en relación a la supervivencia espermática y fertilidad de los EE al descongelado, posibilitarán en el futuro la aplicación frecuente de esta biotecnología. Si bien se ha trabajado en criopreservación de semen canino con DIL que poseen detergentes en su composición, existe escasa información respecto a la

congelación de espermatozoides recuperados de EPI refrigerados, así como sobre la adición de diferentes sustancias adicionadas a los DIL y su efecto sobre la criopreservación de los EE.

En la especie canina, existen algunos estudios sobre recuperación, refrigeración y criopreservación de espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo. Hewitt y col, 2001 estudiaron la supervivencia de EE congelados-descongelados utilizando diferentes porcentajes de glicerol. Este estudio no reveló diferencias significativas entre las cuatro concentraciones de glicerol utilizadas. Este trabajo demuestra que la criopreservación de espermatozoides del epidídimo canino puede realizarse utilizando métodos similares a los establecidos para los eyaculados de la misma especie y que, a pesar de algunos daños, los espermatozoides conservan su capacidad funcional.

Yu y Leibo, 2002 estudiaron el efecto sobre la motilidad, integridad de membrana plasmática y acrosomal de EE caninos refrigerados. Estos autores, concluyeron que incluso después del almacenamiento durante 192 h (8 días) a 4°C, podrían recuperarse EE móviles y, que tales espermatozoides refrigerados eran capaces de unirse a la zona pelúcida

En esta especie la habilidad para la fertilización de los EE se ha demostrado con el nacimiento de crías luego de IA con gametas recuperadas y criopreservadas de los EPI (Marks y col, 1994; Hori y col, 2011). Ponglowhapan y col, 2008 evaluaron adición y efecto del Equex STM Paste sobre la calidad de los EE criopreservados La suplementación con Equex STM en el diluyente de semen, fue eficaz para la congelación de los EE caninos protegiendo la integridad acrosómica contra el daño inducido por la criopreservación y prolongando después de la descongelación la motilidad de los espermatozoides durante la incubación a 37°C

Asimismo, se estudió el agregado de Sodio dodecil Sulfato (SDS) detergente aniónico que solubiliza eficazmente los lípidos sólo o como un componente del Equex STM® paste o Orvus ES Paste® (Helenius y Simons, 1975). Recientemente, se estudió el SDS comparando el efecto de Tris base (TRISBA) con el TRISBA mas el agregado de 0,25% de SDS (TRIS SDS) como diluyente para la criopreservación de EE caninos obteniéndose mayor sobrevida de los EE durante el proceso de congelación – descongelación con el SDS (Tittarelli, 2014).

Estas mejora con el agregado de SDS coincide con lo observado en varios trabajos con espermatozoides seminales caninos ((Rota y col, 1997; Peña y Fosberg, 2000a; Stornelli y col, 2001; Ponglowhapan y Chatdarong, 2008).

Podemos concluir que el SDS, mejora también la supervivencia pos-descongelación de los EE caninos, contribuyendo al conocimiento de esta biotecnología que posibilita la conservación de material genético de animales de gran valor que mueren inesperadamente aún cuando no sea posible recuperar y criopreservar inmediatamente las gametas ya que se han recuperado espermatozoides viables aún luego de 72h post-mortem (Tittarelli, 2006) El almacenado temporal de los EPI a 4°C en SF durante 24 ó 48 horas, permite recuperar espermatozoides viables en un laboratorio equipado para la recuperación y criopreservación espermática. Estos hechos hacen posible recuperar material valioso que de otra forma se perdería, posibilitando la preservación de gametas de especies de alto valor genético en el planeta.

Finalmente, cabe destacar, que la criopreservación de EE caninos y felinos es útil como modelo experimental para cánidos y félidos silvestres en vías de extinción aumentando su posibilidad de preservación previniendo su desaparición definitiva de nuestra tierra, llevándose consigo sus características genéticas y probables adaptaciones específicas al medio que habitaban (Pukazhenthil, 2004).

Bibliografía

- Aguado, M. J., Garde, J., Madriadano, J. M., Perez, S, Garrido, D., Montoro, D. (1994). "Congelación post mortem de semen de epidídimo de morrueco." *Actas de las VII Jornadas Internacionales de Reproducción Animal e Inseminación Artificial*. (pp 283). Murcia, España
- Althouse, G. C Wilson, M. E., Kuster, C., Parsley, M.(1998). "Characterization of lower temperature limitations of fresh-extender porcine semen". *Theriogenology* (50), pp. 535-543.
- An, T. Z., Wada, S., Edashige, K., Sakuray, T., Kasai, M. (1999). "Viable spermatozoa can be recuperated from refrigerated mice up to 7 days after death". *Cryobiology* (38), pp. 27-34
- Arriola, J., Foote, R. H., (1987) "Glycerolation and thawing effects on bull spermatozoa frozen in detergent-treated egg yolk and whole egg extenders". *J Dairy Sci*; (70) pp. 1664-1670
- Asa, C.S. "Wild mammals in captivity: principles and techniques for zoo management,". (2010) *Reproductive physiology*; pp 411-428.
- Barker, C.A.V., Gandier, J.C.C. (1957). "Pregnancy in a mare resulted from frozen epididymal spermatozoa". *Can J Comp Med Vet Sci* (21), pp. 45-51.
- Bateman, H.L., Hay, M.A., Mastromonaco, G.F., Ryckman, D.P. and Goodrowe, K.L. (2000). "Characterization of canine epididymal spermatozoa". *Theriogenology* (53), :pp.486 abstr.
- Blash, S, Melican, D, Gavin, W. (2000). "Cryopreservation of epididymal sperm obtained at necropsy from goats". *Theriogenology* (54) pp. 899-905.
- Bruemmer, J.E., Reger, H, Zibinski, G, Squires, G.E. (2002). "Effects of storage at 5°C on the motility and cryopreservation of stallion epididymal spermatozoa" *Theriogenology* (58) pp. 405-407
- Deneb, P., Cob, L., Rivera, J, Domínguez, Á, Baeza, J, Ugalde, J. (2013) "Efecto de la adición de un surfactante (Orvus es paste®) en el diluyente de congelación sobre la calidad y la capacidad fecundante del semen ovino de pelo (*Ovis aries*) congelado" *Revista Científica, FCV-LUZ*; XXIII, (1): pp.48 – 53.
- Diaz, G.B., Ojeda, RA. (2000). *Libro Rojo de Mamíferos Amenazados de la Argentina*. (Sociedad Argentina para el Estudio de los Mamíferos); Mendoza. SAREM.
- Foote, R.H. (2000). "Letter to the editor". *J Androl* (21) pp. 355.
- Fuller, S.J., Whittingham, D.G. (1996). "Effect of cooling mouse spermatozoa to 4°C on fertilization and embryonic development". *J Reprod Fertil* (108) pp. 139-45.
- Gañán. N., Gomendio, M., Roldan,. E.R.S (2009). "Effect of storage of domestic cat (*Felis catus*) epididymides at 5 8C on sperm quality and cryopreservation". *Theriogenology* (72) pp.1268–1277
- Garde, J., Aguado, M. Montoro, V., Perez Guzman, M.D., García, O., Perz, E, et al. (1994a). "Estudio post-mortem de la viabilidad y del poder fecundante del semen del morrueco". Resultados preliminares. En: *Resúmenes de las XVIII Jornadas de la SEOC*, (pp. 533-7). España.

- Garde, J., Perez; S.S., Aguado, M., Garrido, D., Ayllon, E., Montoro, V., et al. (1994b). "Evolución post-mortem de la viabilidad y de la capacidad fecundante del semen de ciervo y de muflon". En: *Resúmenes de las XIX Jornadas de la SEOE*, (pp. 542-5). Burgos, Spain,
- Graff, K.J, Chandler, J.E., Reggio, B.C., Lim, J.M., Canal, A., Carter J.A., et al. (1996). "Pregnancies obtained from IVF with noncapacitated epididymal bovine spermatozoa". In: *Proceedings 3rd International Meeting of Biotechnology and Animal Reproduction*, (pp.19-21) , Cairo, Egypt.
- Graham, E.F., Rajamannan, A.H.J., Schmehl, M.K.L., Maki-Laurila, M., Bower, R.E. (1971) "Preliminary report on procedure and rationale for freezing boar semen". *AI Digest*, (19) pp. 12-14,
- Hay, M.A. and Goodrowe, K.L. (1993). "Comparative cryopreservation and capacitation of spermatozoa from epididymides and vasa deferentia of the domestic cat". *J Reprod Fert* (47) pp.297-305.
- Helenius, A., Simons, K. (1975) "Solubilization of membrane by detergents" *Biochimica et Biophysica*; (415) pp. 29-79.
- Hewitt, D.A., Leahy, R., Sheldon, I.M., England, G.C.W. (2001). Hishinuma M, K Suzuki, J Sekine. 2003. "Cryopreservation of epididymal dog sperm". *Anim Reprod Sci* (67) pp. 101-111
- Hishinuma, M., Suzuki, K., Sekine, J. (2003). "Recovery and cryopreservation of sika deer (*Cervus nippon*) spermatozoa from epididymides stored at 4°C". *Theriogenology* (59) pp. 813-820.
- Hori, T., Matsuda, K., Kobayashi, M., Kawakam, E., Tsutsui, T. (2011) "Comparison of Fertility on Intrauterine Insemination between Cryopreserved Ejaculated and Cauda Epididymal Sperm in Dogs". *Journal of Veterinary Medical Science* Vol. (73) 12 pp.1685-1688
- Ito, S., Niewa, T., Kudo, A. (1948). "Studies on the artificial insemination in swine". *Zootech Exp Sta Min Agr For (Chiba)*, 55. (citado por Althouse, 1998).
- IUCN. (2008). *Red List of Threatened Species*
- Iwamatsu Y, MC Chang. (1971). Factors involved in the fertilization of mouse eggs in vitro. *J Reprod Fertil* (26) pp. 197-208.
- Jurado, S, CM. Tittarelli; Peralta R; Guzzetti J; Nuñez Favre R; Savignone C; Stornelli, MC; de la Sota R;. Stornelli MA. (2009) "Efecto del medio de transporte y tiempo de almacenamiento a 4°C sobre la ultraestructura de epididimos felinos". *10th Inter-American Congress of Electron Microscopy 2009. CIASEM 2009. 1st Congress of the Argentine Society of Microscopy SAMIC*. Presentación Póster. L-M42. Rosario City – Argentina..
- Kaabi, M., Paz, P., Alvarez, M., Anel, E., Boixo, J.C., Rouissi, H., Herreraez, P., Anel, L. (2003). "Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem". *Theriogenology* (60) pp. 1249–1259.

- Kikuchi, K., Nagai, T., Kashiwazaki, N., Ikeda, H., Noguchi, J., Shimada A. and col. (1998). "Cryopreservation and ensuing in vitro fertilization ability of boar spermatozoa from epididymides stored at 4°C." *Theriogenology* (50) pp. 615-623.
- Kishikawa, H., Tateno, H., Yanagimachi, R. (1999). "Fertility of mouse spermatozoa retrieved from cadavers and maintained at 4°C". *J Reprod Fertil* (116) pp. 217-22
- Kitt, T, L Schulz y col. (1985). *Tratado de Anatomía Patológica General*. (2da ed.) Barcelona.Labor,.
- Marks, S., Dupuis,J., Mickelsen, W., Memon,C., Platz, M. (1994). "Conception by use of post mortem epididymal semen extraction in a dog". *J Am Vet Med Assoc* (204) pp.1639-1640.
- Mazur, P. (1970) "Cryobiology: the freezing of biological system" *Science* (168): pp.939-949,
- Mazur, P., Leivo, S.P., Chu, E.H.Y. (1972a) „Two-factor hypothesis of freezing injury“. *Exper Cell Res*; (71) pp.345-355,
- Meintjes, M. C., Bezuidenhout, P., Bartels, D.S., Visser, J. Meintjes, N., Loskutoff, M.,et al. (1997). In vitro maturation and fertilization of oocytes recovered from free-ranging Burchell's Zebra (*Equus burchelli*) and Hartmann's Zebra (*Equus zebra hartmannae*)". *J Zoo Wildl Med* (28) pp. 251-9
- Pendfold, L.M., Moore, H.D.M. (1993) "New method for cryopreservation of mouse spermatozoa" *J Reprod Fertil*; (99) pp.131-134,
- Peña, A., Linde-Forsberg, L.C. (2000). "Effects of spermatozoal concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa". *Theriogenology* (54) pp. 703-718.
- Peña, A., Forsberg, L.C. (2000a). "Effects of Equex, one- or twostep dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa". *Theriogenology* (54) pp.859-875,
- Peña, A.I., Quintela, L.A., Barrio, F., Herradón, P. (1994): "Efecto de la adición de Dodecil Sulfato Sódico sobre la supervivencia postdescongelación de espermatozoides caninos". In: *Proc 7th International Meeting on Animal Reproduction*, (pp. 481.. Murcia,
- Ponglowhapan, S., Chatdarong K.. (2008). "Effects of Equex STM Paste on the quality of frozen-thawed epididymal dog spermatozoa". *Theriogenology* (69) pp.666–672
- Pope, C.E., Johnson, C.A., McRae, M.A., Keller, G.L., Dresser, B.L. (1998). "Development of embryos produced by intracytoplasmic sperm injection of cat oocytes". *Anim Reprod Sci* (53) pp. 221-36
- Pushett, D.A., Lacham-Kapln, O., Gunn, I.M., Trounson, A.O. (2000). "Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) using epididymal sperm and in vitro -matured oocytes in domestic cat: A model for endangered species". *Theriogenology* (53) pp.400 (abstract).
- Roldan, E.R.S., Gomendio, M. (2009). *Sperm and conservation*. In: Birkhead, T.R., Hosken, D., Pitnick, S., editors. *Sperm Biology*. Academic Press;. pp. 539–64.
- Rota, A., Strom, B., Fosberg, C.L., Rodríguez-Martínez, H. (2000) "Effects of EQUEX STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C". *Theriogenology* 1997; 47:1093-1101,

- Salamon, S, WM Maxwell. (2000) "Storage of ram semen". *Anim Reprod Sci* (62) pp. 77-111.
- Sankai, T, Tsuchiya, H. and Ogonuki, N. (2001) "Short-term nonfrozen storage of mouse epididymal spermatozoa". *Theriogenology* (55) pp. 1759-1768.
- Sato, M, Ishikawa, A.,(2004). "Room temperature storage of mouse epididymal spermatozoa: exploration of factors affecting sperm survival". *Theriogenology* (61) pp. 1455-1469.
- Savignone, C., Tittarelli, C., Arnaudín, E., Stornelli, M. C., Stornelli, M.A., de la Sota, R.L. (2004). "Survival of chinchilla laniger spermatozoa stored in the epididymides at 4°C and transported in three different media". *Proceedings of the 5th International Symposium on Companion and Exotic Animals*; (pp 261 – 262). San Pablo, Brazil
- Song, H.B., Melican, D., Gavin, W. (1988) "In vitro fertilization of goat follicular oocytes with epididymal spermatozoa". *Korean J Anim Sci* (30) pp. 636-42.
- Songsasen, N., Betteridge, K.J., Leibo, S.P. (1997). "Birth of live mice resulting from oocytes fertilized in vitro with cryopreserved spermatozoa". *Biol Reprod* (56) pp.143-52
- Stilley, K., Pope, C.E., Leibo, S.P., et al. (2000). "Survival of canine epididymal sperm stored at 4°C in the testicles". *Theriogenology* (53) pp. 489 abstr.
- Stornelli, M.A., Reyna, J.C., Stornelli, M.C., Nuñez Favre, R., Savignone C.A., Tittarelli, C.M., de la Sota, R.L. (2009) "Seasonal changes in testis cell morphology in male domestic cats (*Felis catus*)". *Repro Dom Anim.* (44) pp. 287-290
- Swanson, W.F. (2006). "Application of assisted reproduction for population management in felids: the potential and reality for conservation of small cats". *Theriogenology*; (66) pp.49–58.
- Tittarelli, C.M., Savignone, C., Arnaudín, E., Stornelli, M.C., Stornelli, M.C.; de la Sota, R.. (2006). "Effect of storage media and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides". *Theriogenology* (66) pp. 1637-1640
- Tittarelli, C.M., Jurado, S.B., Núñez Favre, R., Bonaura, M.C., de la Sota, R.L., Stornelli, M.A. (2012a). "Effect of storage media and storage time on histological and ultrastructural changes in cat epididymal cells". *Reprod Dom Anim* 47 (Suppl. 6) pp.281–283
- Tittarelli, C.M., Jurado, S.B., Sarmiento, P., Praderio, R.G., Stornelli, M.C., de la Sota, R.L., Stornelli, M.A. (2013) "Efecto del tiempo y el medio de almacenado sobre los cambios microscópicos y ultramicroscópicos de epidídimos caninos". *XII Congreso Interamericano de Microscopía (CIASEM 2013)*. Cartagena de Indias, Colombia.
- Tittarelli, C.M., Nuñez Favre, R., Praderio, R., Bonaura, M.C, Silvestrini, M.P., de la Sota, R.L., Stornelli, M.A. (2012) "Descenso térmico intraepididimal ocurrido en diferentes medios de almacenado a 4°C (Intraepididymal temperature decrease in different storage media at 4°C)". *XXIII Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias PANVET*. Cartagena de Indias, Colombia . Presentación póster.
- Tittarelli, C.M., Stornelli, M.C., Giménez, F., Savignone, C.A., de la Sota, R.L., Stornelli, M.A. (2007) "Recuperacion espermatica epididimal como medio para preservar material genético". *Revista Veterinaria Cuyana*, 2(1) pp. 1-5.

- Tittarelli, C.M. (2014). Viabilidad de espermatozoides epididimales caninos y felinos almacenados bajo diferentes condiciones. Tesis doctoral. FCV, UNLP, Argentina.
- Walton, A. (1930). "The effect of temperature on the survival in vitro of rabbit spermatozoa obtained from the vas deferens". *J Exp Biol* pp.201-219.
- Watson, P.F. (1976) "The protection of ram and bull spermatozoa by the low density lipoprotein fraction of egg yolk during storage at 5° C and deep-freezing". *J Thermal Biol*; (1) pp.137-141.
- Watson, P.F.. (2000) "The causes of reduced fertility with cryopreserved semen". *Anim Reprod Sci*; (60) pp.481-92.
- Yonai, M., Geshi, M., Nagai, T. (1998). "The effect of storage temperature of epididymis with testes on motility of sika deer (*Cervus nippon*) and equine spermatozoa". *Tohoku J Anim Sci Technol* (47) pp. 20-23.
- Yu, I., Leibo, S.P. (2002). "Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4°C". *Theriogenology* (57) pp. 1179–1190.

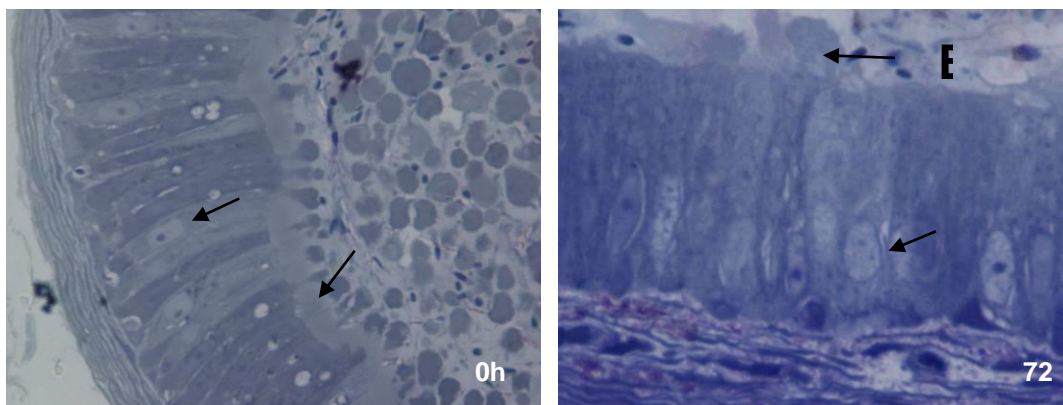


Foto.1: Cambios morfológicos en epidídimos felinos entre 0 y 72 horas (h). Azul de Toluidina, Obj, 100X. N: núcleo, E: estereocilia.

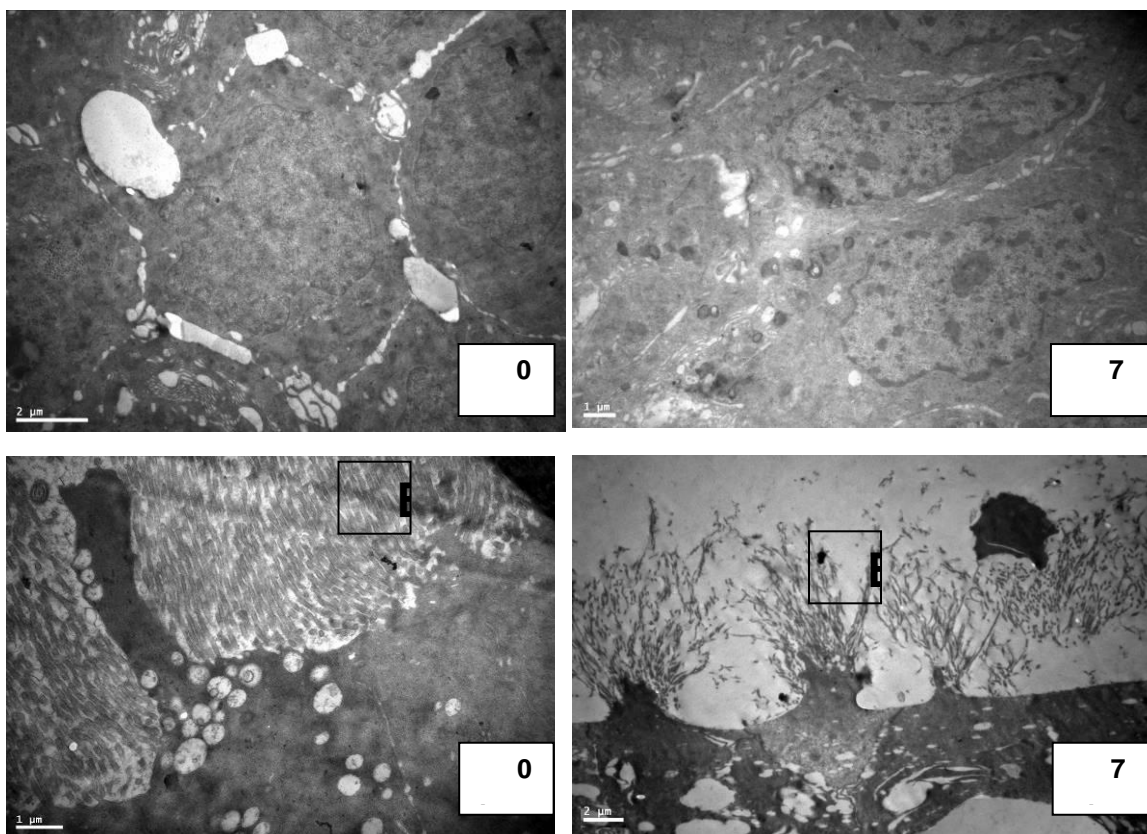


Foto.2: Microfotografía de cambios en núcleos y esterocilias de epidídimos felinos entre 0 y 72 horas (h). N: núcleo, E: estereocilia.

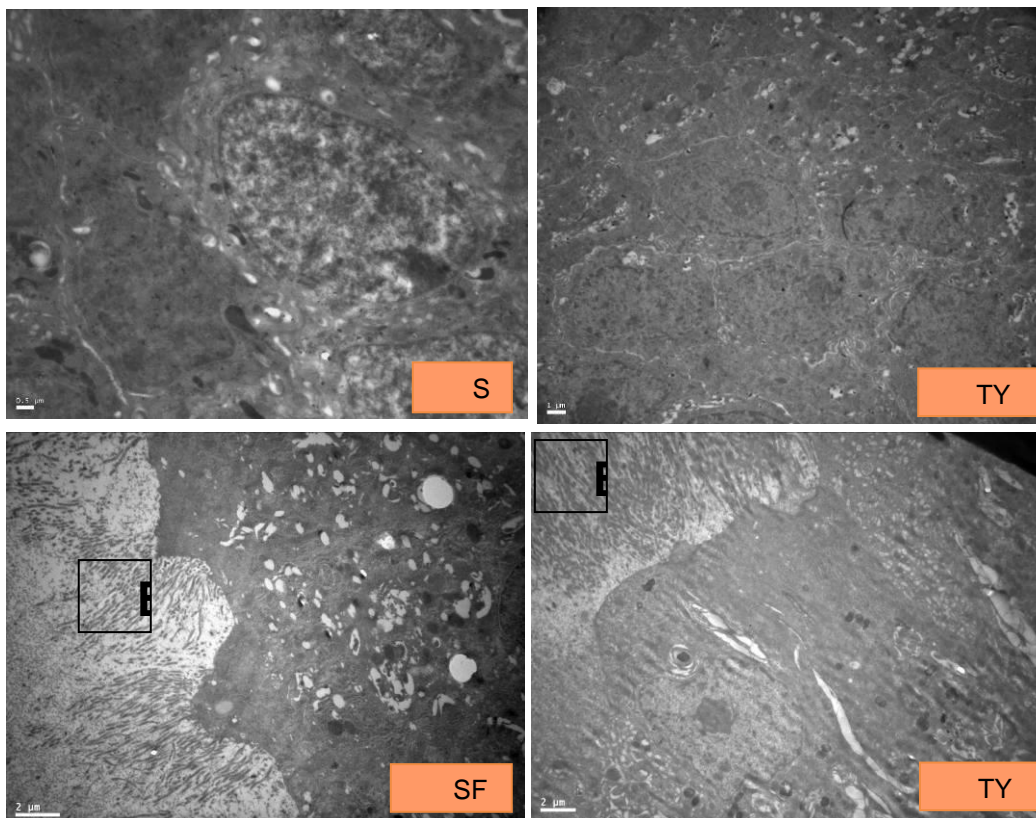


Foto.3: Microfotografía mostrando cambios en núcleos (N) y esterocilias (E) de epidídimos felinos en distintos medios. SF (solución fisiológica), TYH (tris yema de huevo)

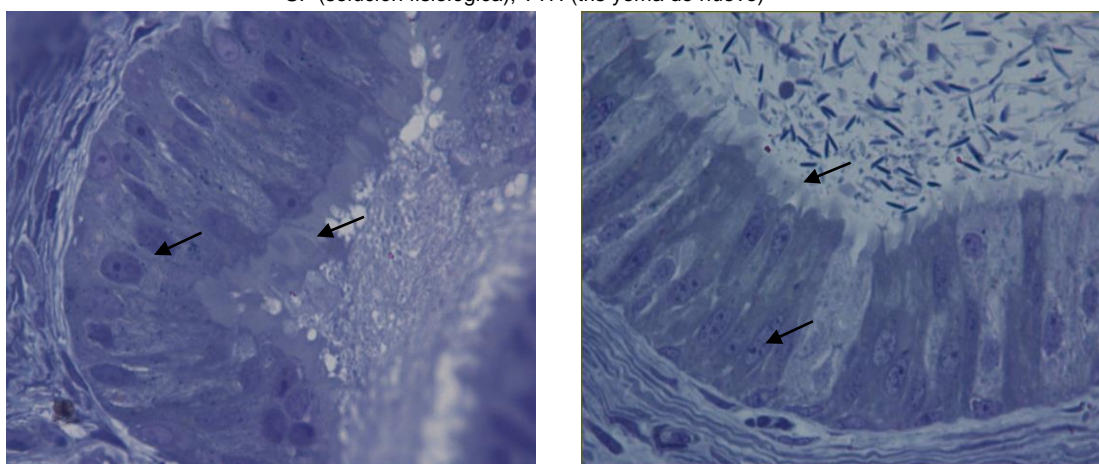


Foto.4: Cambios morfológicos en epidídimos caninos entre 0 y 72 horas (h). Azul de toluidina, Obj, 100X. .N: núcleo, E: estereocilia.

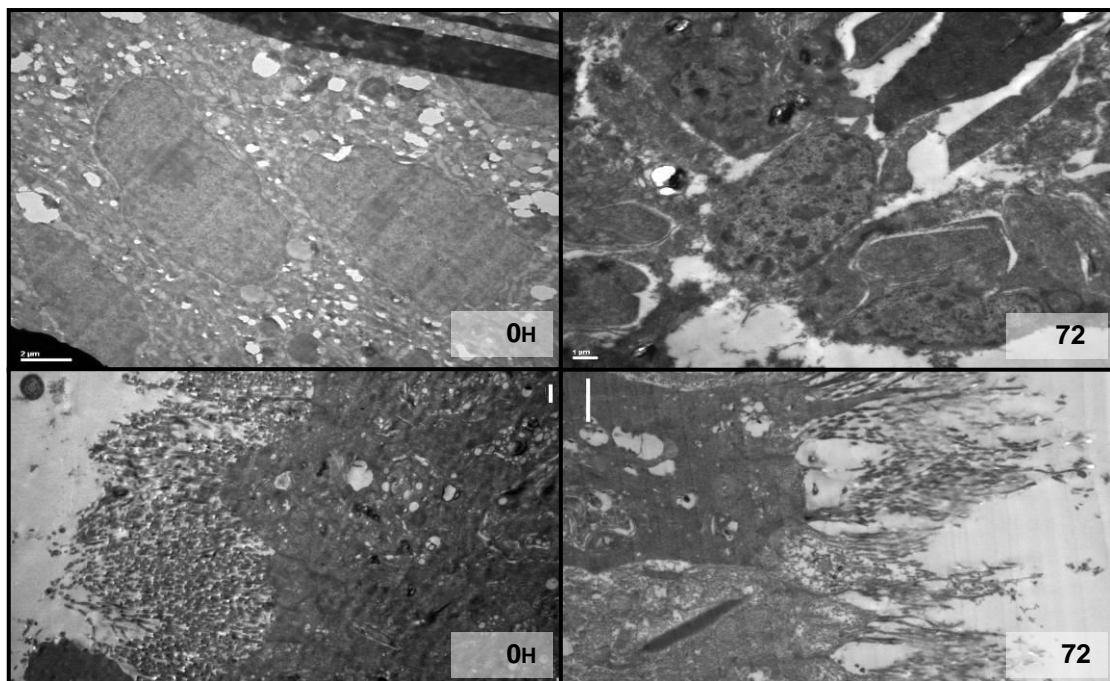


Foto.5: Microfotografía mostrando cambios en núcleos y estereocilias de epidídimos caninos entre 0 y 72 horas (h). .N: núcleo, E: estereocilia.

SECCIÓN II

Equinos



CAPÍTULO 31

Extracción y evaluación de semen en el padrillo

Miriam Azcurra, Jessica Vleck

Generalmente los equinos usados como reproductores son animales que se han retirado de la competencia para comenzar su vida reproductiva. Sin embargo en ciertas disciplinas ecuestres como el salto, competencia de rienda, polo, los caballos son utilizados como reproductores al mismo tiempo que desarrollan su actividad deportiva. La transición de la competencia a la reproducción es una etapa que requiere tiempo y paciencia, donde hay que considerar los cambios fisiológicos y psicológicos que el caballo debe superar. Esto se verá reflejado a largo plazo en el rendimiento del caballo como reproductor. En el caso de los padrillos que son retirados de la competencia lo ideal es que ingresen al haras por lo menos 90 días antes de comenzar la temporada reproductiva. De esta forma el caballo se adapta al nuevo lugar, personal y especialmente al padrillero. Este tiempo también es necesario para disminuir los niveles circulantes en sangre de cortisol y drogas utilizadas durante su desempeño deportivo que pueden afectar la calidad seminal y la conducta reproductiva. El stress y la temperatura escrotal asociados al entrenamiento intenso pueden tener efectos deletéreos sobre la función testicular, sin embargo, en la mayoría de los padrillos la función reproductiva se restablece entre dos a cuatro meses después que son retirados del entrenamiento.(Brinsko,2012). En los padrillos que continúan en competencia, una de las mayores preocupaciones de los entrenadores es que el padrillo pierda su concentración deportiva y tenga comportamientos inapropiados en el ámbito deportivo. Para evitar esto es imprescindible seguir pautas que ayuden a los padrillos (doble propósito) a diferenciar claramente el ambiente deportivo del reproductivo. Medidas como destinar personal diferente

para cada actividad, lugar físico diferente, cabezadas y embocaduras diferentes, así como el diseño de una rutina para cada actividad, permite al animal diferenciar el ambiente deportivo del reproductivo.

Extracción de la muestra seminal

El método más utilizado para la extracción de semen en el padrillo es mediante el uso de una vagina artificial.

La colecta de semen puede realizarse en un Galpón o Sala de monta, o en un lugar abierto destinado para esta actividad (Foto 1). En cualquier caso debe ser un lugar espacioso con ausencia de elementos que puedan interferir con la colecta y provocar accidentes que afecten tanto al personal como al padrillo. Cuando se utiliza un lugar abierto se tendrá en cuenta que sea un lugar alto, de pasto corto y de escasa circulación para evitar la distracción del padrillo. Los pisos de arena y de tierra son pocos limpios y en lugares ventosos pueden contaminar el material seminal colectado. Si se cuenta con una Sala de monta uno de los puntos críticos es el piso de la misma, ya que tendría que ser de un material capaz de absorber el impacto al momento del salto del padrillo para evitar provocar lesiones, o que padrillos con lesiones no salten o no consigan la eyaculación a consecuencia del dolor. Además debe ser de fácil limpieza, rápido secado y antideslizante. El lugar para la colecta debe ser próximo al laboratorio donde se procesará la muestra.

Se puede hacer saltar al padrillo sobre una yegua en celo (natural o inducido) o un maniquí (Foto 2). En caso de utilizar una yegua hay que considerar que sea mansa, de la altura adecuada para el padrillo y contar con medios de sujeción como los trabones de servicio y una mordaza de ser necesario. Se debe vendar la cola e higienizar la zona del periné. Suele ser de buena práctica atar la cola de la yegua pasándola por entre los miembros y sujetándola al trabón a nivel del cuello. De esta forma la cola no molesta y al quedar cubriendo la vulva evita que el padrillo penetre en la yegua en caso que el operador no pueda realizar a tiempo la desviación del pene. (Foto 3). Se puede proteger la cruz y crinera de la yegua de la posible mordedura del padrillo con una manta o dispositivo de cuero confeccionado para esto, además existen cobertores para las patas traseras para evitar posibles pisadas del padrillo (Foto 4 y 5). Cuando se utiliza una yegua para la colecta durante la estación no reproductiva, por ejemplo en un centro de congelación, debemos inducir el comportamiento de celo de las yeguas en anestro mediante la administración de estrógenos exógenos (5 a 10 mg de 17beta estradiol IM, 4horas previo a la colecta; Brinsko, y col. 1993). También es posible inducir comportamiento de celo con estrógenos en yeguas ovariectomizadas, en las que la respuesta es más regular. Para minimizar los riesgos para el padrillo y el operador y evitar la necesidad de disponer de una yegua para la colecta se puede utilizar un maniquí. Existen distintos tipos y modelos todos ellos deben ser acolchados, de fácil limpieza y altura regulable. Aunque se cuente con un maniquí, al

inicio del entrenamiento del padrillo para la colecta es necesario contar con una yegua en celo para estimular al padrillo. En caballos de buena libido, una vez que asocian el maniquí con la monta y la eyaculación, se podrá prescindir de la presencia de una yegua.

En padrillos muy tímidos o distraídos la administración endovenosa lenta de diazepam (0,05mg/kg; 20 mg dosis máxima) 5 a 10 minutos previos a la presentación de la yegua puede ayudar a que el padrillo supere su ansiedad y mantenga la concentración (Brinsko, 2012)

Modelos de vagina artificial

Todos los modelos de vagina artificial constan de una cámara de agua, una parte rígida que mantendrá la forma de la misma y desde donde se manipulará, un colector y un protector para aislar a este último de los factores externos como luz, frío, etc. Los materiales de cada una de las partes de la vagina varían con cada modelo siendo el objetivo final común lograr las condiciones de temperatura y presión necesarias para estimular la eyaculación en el padrillo.

Los distintos modelos reciben su nombre según la Universidad o entidad donde se han desarrollado. Los modelos de vagina artificial más frecuentemente usados son los europeos y los americanos (Tabla 2 y 3). Hay otros modelos como por ejemplo el Modelo Biotech Botucatu (Brasil), el modelo Nishikawa (Japón) y versiones modificadas de los modelos originales.

Modelo Missouri

La cámara de agua queda formada por un tubo cilíndrico de doble pared de látex (manguito) que tiene un extremo abierto y el otro extremo se continúa con un cono de simple pared donde va conectado el colector. El agua caliente se introduce en la cámara mediante una válvula por la que también puede introducirse aire para regular la presión interna. El colector debe tener capacidad suficiente para recibir el eyaculado, ser de fácil limpieza o descartable y que conecte en forma segura con el cono. Pueden ser recipientes de vidrio o plástico graduados o bolsas para colecta. El modelo, tiene un cobertor que se une a la parte rígida en el extremo donde está el colector para aislarlo de factores externos como la luz, baja temperatura ambiente, etc. que pueden afectar la muestra.

Modelo INRA (Instituto Nacional de Investigación Agronómica, Francia)

La parte rígida está formada por un tubo de PVC que tiene dos manijas para sostener la vagina. Por dentro del tubo rígido se colocan tubos de látex (camisa) que se revierten en ambos extremos del tubo y se aseguran con bandas para evitar que se desprendan durante la colecta. La cámara de agua queda formada entre el tubo y la camisa. Se llena de agua por una válvula en la parte rígida. Puede colocarse otra camisa de látex más fina y suave que tomara contacto con el pene del padrillo. En uno de los extremos va un cono de látex en donde irá conectado el colector, las características de este último son similares a las del modelo anterior. También posee un cobertor para el colector.

Modelo Colorado

Semejante al modelo anterior. La parte rígida es de plástico (tubular). Por dentro de la misma va un tubo de goma que se rebate sobre los extremos y se fija mediante bandas y un segundo tubo de goma al que se adapta el colector. Para completar el modelo se incluye un cono de material aislante que protege el colector (cobertor). Se comercializa de diferentes dimensiones según el tipo y raza de equino con el que se utilice.

Modelo Hannover

Consta de un tubo de goma dura, en el extremo donde va el colector, presenta una reducción de la luz con la función de imitar el fondo de la vagina de la yegua, el contacto (choque) del glande del pene con esta estrechez colabora con la estimulación del padrillo. La cámara de agua se forma entre el tubo de goma y una camisa interna de látex. En el extremo mas estrecho va ensamblado el colector a la camisa.

Para casi todos los modelos están disponibles camisas internas descartables que hacen más fácil la limpieza y son muy seguras desde el punto de vista sanitario. También existen filtros descartables que pueden ser colocados directamente en el colector.

Preparación de la Vagina Artificial (VA)

Una vez ensamblada la VA para obtener la presión y temperatura interna necesaria, se llena la cámara de agua con agua a 55 – 57°C aproximadamente. También puede insuflarse aire en la cámara de agua y colocar un guante descartable dentro de la VA y llenarlo de agua a 55°C. De esta forma se logra alcanzar la temperatura requerida de 42°C a 44°C en el interior de la VA. La temperatura puede ser chequeada con termómetros especiales para este uso.

Para la lubricación de la VA debe utilizarse un producto no espermicida, soluble en agua. Se distribuye uniformemente una pequeña cantidad de lubricante sobre la superficie interna de la vagina (sobre todo en el extremo por donde penetra el padrillo) utilizando un guante plástico descartable.

Preparación del padrillo para la colecta

El padrillo debe ingresar al lugar de colecta una vez que tenemos la yegua preparada y la VA lista. Se debería entrenar al padrillo para comportarse adecuadamente en el momento de la colecta. Es necesario que el animal aprenda a detenerse y retroceder cuando se le ordena. Para conducir al padrillo puede utilizarse un bocado de cadena de aproximadamente 70cm, unido a un cinta de cuero o soga de 3,5mts, utilizando la mínima presión necesaria para el control del padrillo. En algunos caballos que se sienten cohibidos por esta sujeción puede pasarse la cadena por sobre la nariz y responderán de forma adecuada. Otros padrillos más dóciles pueden manejarse solo con bozal. La norma es lograr el control del animal con la mínima restricción.

Otro punto a que tener en cuenta antes de la colecta es la higiene del padrillo. Se realiza mientras el pene está en erección. Si es suficiente solo con agua tibia hay que evitar el uso de detergentes o antisépticos que pueden alterar la flora normal y ser espermicidas. De ser necesario se utilizan jabones neutros tomando la precaución de enjuagar bien. (Yates y col. 1993). Hay que secar perfectamente el pene utilizando idealmente toallas descartables. La limpieza puede realizarse inmediatamente antes de la colecta, una vez que alcanza la erección o dejarlo como tarea previa para el padrillero sobre todo en caballos donde la limpieza puede alterar su comportamiento durante la colecta. En este último caso se requiere la administración de fármacos miorrelajantes para conseguir la exteriorización del pene. Mientras el padrillo se mantenga limpio no es necesario realizar la limpieza antes de cada colecta.

Procedimiento para la colecta

La libido y capacidad de monta son evaluadas durante la colecta de semen. El padrillo debe entrar en erección a los 2 minutos de presentada la yegua y montar un minuto mas tarde. Debe realizar 5 a 8 movimientos pélvicos y eyacular en el primer o segundo intento, luego de 2 a 5 minutos totales.(Mc Donnell, 1992)

Un problema común en padrillos nuevos, es el temor a demostrar su comportamiento reproductivo normal. Durante la vida deportiva la mayoría de los caballos son condicionados negativamente cuando demuestran interés sexual en una yegua. Para revertir esto es necesario tiempo, paciencia y permitir comportamientos o acciones que no serían aceptadas en padrillos experimentados como montar a la yegua por el costado o sin haber logrado una completa erección. Una vez que logra montar y eyacular se lo puede ir disciplinando con las sucesivas colectas. (Brinsko, 2012)

El padrillo es conducido hacia la yegua en celo o maniquí. El comportamiento precopulatorio normal del padrillo incluye olfateo, lamido, mordisqueo de la yegua, signo de Flehmen, patadas o manoteos, vocalización, variando la frecuencia e intensidad de estas manifestaciones con cada padrillo. (Mc Donnell, 1992).El comportamiento sexual es variable según los distintos padrillos, pero es consistente para cada padrillo sobre todo si no se altera la rutina y condiciones de manejo durante la colecta. La estimulación prolongada frente a una yegua incrementará el volumen seminal total, pero no el número de espermatozoides totales del eyaculado. El aumento del volumen se debe sobre todo al incremento de la fracción gelatinosa lo cuál no es beneficioso para la motilidad espermática. (Jasko, 1992)

Una vez lograda la erección se lleva al padrillo hacia el posterior de la yegua o el maniquí y se le permite la monta. Cuando el padrillo se ha ubicado sobre la yegua el operador se acerca por un costado, habitualmente del lado izquierdo, y desvía el pene permitiendo que el padrillo penetre en la VA y comience con los movimientos pélvicos. La VA debe mantenerse firme sobre el costado de la yegua con una leve inclinación hacia arriba del extremo del colector imitando la anatomía de la vagina en la yegua. Idealmente el operador debe sostener la VA con una mano y mantener la otra mano sobre la base del pene para percibir las “pulsaciones” durante la eyaculación. Estas pulsaciones se corresponden con los “jets” seminales generalmente en un número de 5 a 10. (Varner y col 1998) La eyaculación puede percibirse externamente además, por los movimientos de “flameo” de la cola, aunque en ocasiones los padrillos presentan esta mímica pero no completan la eyaculación (Foto 6). Cuando comienza la eyaculación se debe inclinar levemente el extremo de la VA donde esta el colector hacia abajo, para que el semen fluya rápidamente al colector y evitar el reflujo del semen. Una vez que se completa la eyaculación y el padrillo se relaja, la VA es alejada del pene acompañando el retroceso y descenso del padrillo de la yegua o maniquí. Mantener la vagina vertical y reducir la presión de la VA descartando agua y/o aire de la cámara para que el semen

remanente drene al colector. El colector se desconecta de la VA y se lleva rápidamente al laboratorio para el procesamiento del eyaculado.

Hay situaciones que pueden requerir coleccionar por separado las diferentes fracciones del eyaculado. En este caso se utiliza una VA con el extremo final abierto. Se necesita otra persona que con la ayuda de un embudo conectado al colector “capture” la fracción del eyaculado que sea necesaria.

Los primeros tres “jets” contienen aproximadamente el 70-80% del número total de espermatozoides del eyaculado. Con esta técnica podemos prevenir el contacto de los espermatozoides con el fluido de las glándulas accesorias que afecta negativamente la motilidad. La colecta de la fracción espermática nos permite prescindir de la centrifugación del eyaculado que se utiliza para reducir el plasma seminal, evitando el daño y pérdida de los espermatozoides que causaría la centrifugación. Otra situación que puede requerir la colecta con VA abierta es en caso de inflamación y/o infección. La colecta por separado de las diferentes fracciones nos ayuda a dilucidar la localización del proceso. La observación de un número significativo de neutrófilos y bacterias en una muestra de la fracción rica en espermatozoides sugiere que la infección proviene del testículo, epidídimo o ampollas del conducto deferente. Mientras que la presencia de neutrófilos en la última parte del eyaculado indica afección de las vesículas seminales o próstata. Obtener muestras por separado permite también realizar estudios bacteriológicos de cada fracción. En caso de uropermia la colecta con VA puede evitar la contaminación con orina de la fracción espermática, en el caso que esto suceda en el final de la eyaculación. Lamentablemente el momento de la emisión de orina es impredecible y puede ocurrir en cualquier momento de la eyaculación (Turner y col. 2007).

Métodos alternativos para la colecta de semen

Se reservan para casos en los que es imposible obtener un eyaculado mediante la VA como es el caso de padrillos con lesiones que le impiden montar o cuando no se cuenta con una VA

Inducción farmacológica de la eyaculación

El protocolo más comúnmente usado y confiable para la inducción de la eyaculación sin cópula se basa en la combinación de imipramina (2,2 mg/kg oral) seguida 2 horas después de xilacina (0,66mg/kg). La eyaculación ocurre al principio de la sedación (1 a 3 minutos de administrada la xilacina) o cuando la sedación está desapareciendo (15 a 25 minutos después de la xilacina). Las tasas de éxito reportadas varían de 30 a 75%, esto se puede mejorar ajustando las dosis para cada padrilo en particular. El semen es recolectado en una bolsa no

espermicida, fijada sobre el prepucio. Los eyaculados obtenidos son de alta concentración y bajo volumen de plasma seminal ideales para criopreservar sin centrifugar. La fertilidad y resistencia a la criopreservación son adecuadas. (Tibary y col. 2009)

Estimulación manual

Se utilizan paños húmedos con agua tibia en la base del pene y glande.

Condomes

La calidad del semen obtenido por este método es inferior debido a la marcada contaminación con bacterias y detritus de la superficie del pene (Blanchard y col. 2003)

Evaluación de la muestra seminal

Un punto a considerar para realizar una evaluación representativa y fiel de la calidad seminal de un eyaculado, es saber si el padrillo se encontraba en servicio o en reposo sexual. Ya que en este último caso hay que realizar previo a la evaluación eyaculados de limpieza para eliminar espermatozoides muertos o defectuosos que alteran el resultado de la evaluación. Los valores utilizados como parámetros mínimos aceptables son los aportados por la Sociedad de Teriogenología de los EE UU.

Para no afectar la calidad de la muestra a evaluar hay que trabajar con una temperatura medioambiental de 22°C promedio y sin corrientes de aire. Todo el material que será utilizado debe estar limpio, libre de residuos, perfectamente seco y atemperado a 37°C. En caso que no se haya usado un filtro en el colector, como primer paso se debe filtrar el semen (Foto 7). Puede utilizarse gasa colocada en la boca de una probeta para separar la fracción de gel y otros contaminantes como pelos y esmegma. En padrillos que producen mucho gel puede ser necesario aspirar el gel con una jeringa y luego filtrarlo.

Evaluación macroscópica

Determinar y registrar el volumen total, volumen libre de gel, color y aspecto. El volumen total esta influenciado por varios factores como la estación del año. Diferencias de hasta el 50%

se han comunicado entre el pico de la temporada y la temporada no reproductiva, debido a la variación en la producción de gel. Otro factor es la frecuencia de colecta, a mas frecuencia menos volumen. La edad también afecta el volumen, hay un incremento desde los 2 años hasta los 16 años. Por último y como se menciono anteriormente la estimulación sexual antes de la colecta tiene efecto sobre el volumen seminal debido al incremento de la fracción gelatinosa del eyaculado. Alteraciones clínicas como la urospermia, piospermia y hemospermia pueden incrementar también el volumen total (Estrada y col. 2007). Registrar el volumen libre de gel es necesario para calcular el número total de espermatozoides del eyaculado.

El color debe ser blanco, en padrillos que no fueron higienizados puede ser algo grisáceo. En caso de contener sangre tomará tinte rojizo o amarillento en caso de urospermia dependiendo el grado de contaminación.

El semen debe ser lechoso variando a acuoso según esté más o menos concentrado

Evaluación microscópica

Motilidad individual

Dentro de la evaluación microscópica del semen se debe determinar el porcentaje de espermatozoides móviles (motilidad total) y tipo de motilidad (rectilínea, progresiva, en círculos). Además se evalúa el vigor (velocidad) del movimiento, expresado en una escala de 0 a 5 (0 = inmóviles y 5 = avanzan rápidamente en el campo) (Rutter y Russo, 2006) .Para ello se coloca una gota de semen (7-10ul) entre un porta y cubre tibios, para ser observado al microscopio sobre platina térmica a 37°C. Se realiza la evaluación con objetivo de 10X y 40X, se observan varios campos preferentemente con un microscopio óptico con contraste de fase. La motilidad será evaluada tanto en una muestra sin diluir, como en una muestra diluida con un diluyente adecuado (dilución 1:20) dependiendo de la concentración. Hay evidencia clínica y experimental que el plasma seminal puede ser toxico o al menos reducir la motilidad en algunos padrillos. (Magistrini, M. 2000) La motilidad debe determinarse rápidamente antes de los 5 minutos de colectado el semen. Este es un método subjetivo, otra posibilidad es utilizar un analizador computarizado de motilidad pero debido a su alto costo es justificable para la evaluación objetiva de la motilidad relacionada a proyectos de investigación. La mayoría de los padrillos fértiles tienen una motilidad progresiva $\geq 50\%$

Sobrevida espermática

Consiste en observar como evoluciona la motilidad en función del tiempo en muestras sin diluir o en muestras diluidas. Puede realizarse a diferentes temperaturas (22°C, 37°C, 4°C) y tiempos. Se evalúa regularmente la motilidad de una alícuota hasta que la motilidad observada sea <10%. (Neild, 2005) En general los padrillos de fertilidad normal tienen una sobrevivencia del semen sin diluir cercana a las 6 horas y en semen diluido cercano a las 24hs. (Ferrer, 2010). Para Magistrini el parámetro más predecible que se correlaciona con fertilidad es el porcentaje de espermatozoides móviles luego de 24 y 48hs almacenados a 4°C diluido con un diluyente apropiado (Magistrini, 2000)

Morfología espermática

El examen se puede realizar utilizando un microscopio de contraste de fase, microscopio de contraste de interferencia diferencial (DIC) o microscopio electrónico. En el caso de utilizar un microscopio con contraste de fase una muestra de semen se diluye en una solución fijadora (solución formulada o glutaraldeído) y se examina una gota entre porta y cubre a 100x (objetivo de inmersión en aceite). Otra posibilidad es realizar la evaluación con un extendido teñido con eosina- azul de anilina u otras tinciones como Giemsa, Casarett, entre otras. Independientemente de la técnica utilizada se evalúan al menos 100 células espermáticas.

Para la interpretación además de tener en cuenta el porcentaje de espermatozoides normales y anormales debemos considerar la frecuencia de cada morfoanomalía. No está claro en qué grado afecta la fertilidad cada anomalía individual, pero si se asume que los padrillos con número alto de anomalías puede tener una fertilidad más baja que un padrillo con un número alto de espermatozoides morfológicamente normales. (Samper, 2000)

Algunos autores consideran que un padrillo de fertilidad normal tendrá más de un 60% de espermatozoides morfológicamente normales y menos de 5% de anomalías de acrosoma y pieza intermedia. (Samper y col. 2007). La clasificación de las anomalías en primarias y secundarias; y compensables y no compensables utilizada en bovinos también se puede adaptar al padrillo. Solo hay que tener en cuenta, una característica particular del espermatozoide equino que es la inserción abaxial de la pieza intermedia, ya que en otras especies es considerado una morfoanomalía.

Para evaluar el acrosoma hay tinciones comerciales como Spermac, triple tinción, entre otras. El estado del acrosoma puede ser evaluado con pruebas fluorescentes como la tinción

con clortetraciclina (CTC) (evalúa capacitación espermática) o mediante lectinas marcadas con Fluoresceína (que evalúa reacción acrosomal).

Concentración espermática

Los métodos que se utilizan para determinar el número de espermatozoides por unidad de volumen son la hemocitometría y fotometría.

Hemocitometría: Se utiliza una cámara cuenta glóbulos (Foto 8 y 9). Es un método directo de referencia para los otros métodos. Puede ser tedioso cuando se tienen muchas muestras o se necesita realizar una rápida dilución como en el caso de la técnica de congelación de semen.

Se debe diluir la muestra en una solución formulada (solución fisiológica formulada al 1%) para matar los espermatozoides y poder hacer el conteo en el retículo de la cámara. La tasa de dilución varía según la cámara que se utilice.

Fotometría: El espectrofotómetro con una curva estándar preestablecida provee una medida indirecta de la concentración basada en el porcentaje de transmisión de la luz a través de la muestra. Tener en cuenta que solo puede utilizarse semen sin diluir ya que las partículas del diluyente u materiales extraños como sangre, orina, arena, esmegma, etc. interfieren con la lectura. Padrillos con semen muy diluido o muy concentrado, o sea con valores de concentración muy extremos también puede dar valores erróneos. (Yates, 1993) Existen equipos (densímetro), con el mismo principio que el espectrofotómetro, calibrados específicamente para equinos que convierten automáticamente el valor de transmisión de la luz de la muestra en la cantidad de espermatozoides por mililitro. También suelen estar programados para calcular el volumen de diluyente necesario a agregar y el número de dosis que serán producidas. (Pickett, 1993) Los equipos deben ser controlados y calibrados periódicamente.

Número de espermatozoides totales

Se obtiene multiplicando la concentración espermática (espermatozoides/ml) por el volumen libre de gel (ml). A partir de este valor y los resultados de la evaluación seminal se puede determinar el número de espermatozoides móviles y normales del eyaculado. Este dato es de mucha importancia para la evaluación de la aptitud reproductiva de un padrillo, y la aplicación de técnicas biotecnológicas como la inseminación artificial, refrigeración o congelación de semen.

Evaluación de la integridad de membrana

La membrana espermática es fundamental para el proceso de fertilización, por lo que en las últimas décadas se le ha dado mucha importancia a esta área de estudio.

Test Hiposmótico (HOS): Una de las pruebas desarrolladas para evaluar la membrana espermática es el test hiposmótico, usado inicialmente en humanos y adaptado con éxito a otras especies como el equino.

Se coloca a los espermatozoides en una solución hiposmótica. Los espermatozoides que posean su membrana funcional tratarán de reestablecer el equilibrio osmótico con el medio que los rodea incorporando agua, lo que provocará la hinchazón o endósmosis de los espermatozoides (anormalidades de cola típicas del engrosamiento sufrido al incorporar agua) (Neild y col. 1999)

Para realizar este test una muestra de semen se incuba durante 30 minutos a 37°C en una solución de fructosa ajustada a 100mOsm. (Estrada y col. 2007) Se colocan 2 gotas de esta dilución entre porta y cubre y se cuentan 100 espermatozoides (microscopio de luz, objetivo 100x) diferenciando los que presentan cola enrollada (reaccionantes, con membrana funcional) de los que se observan con la cola lisa (membrana no funcional) (Foto 10).

El HOS ha demostrado tener una buena correlación con motilidad progresiva y con el número de servicios por preñez, permitiendo tener un indicio de la fertilidad del padrillo (Neild y col. 2000).

Coloración Vital: Las usadas con mas frecuencia son la eosina - nigrosina y la eosina - azul de anilina (Foto 11). La eosina penetra la membrana plasmática que ha perdido la selectividad tiñendo los espermatozoides de color rosa (muertos), en cambio los espermatozoides que mantienen la integridad de membrana repelen la eosina y permanecen sin teñir (vivos). La nigrosina o el azul de anilina da un fondo oscuro que facilita la visualización al microscopio.

En el extremo de un porta objeto tibio se coloca una gota de colorante y una de semen que se mezclan durante 10seg luego se los deja 30seg y se realiza el extendido. Esperar que seque y contar 100 espermatozoides con objetivo de 40x o 100x (inmersión en aceite)

Coloraciones Fluorescentes: En los últimos años ha tenido auge el uso de tinciones fluorescentes para evaluar la viabilidad y funcionalidad espermática. Para su aplicación se requiere el uso equipamiento costoso y no fácilmente disponible como un microscopio de fluorescencia o citómetro de flujo, lo cuál puede limitar su uso a trabajos de investigación. La mayoría de las tinciones fluorescentes se utilizan combinando un fluorocromo impermeable que se une al ADN si la membrana está dañada, con otro fluorocromo permeable a la membrana,

que entra al citoplasma de las células, se esterifica y fluoresce en el interior si la membrana está intacta. (Neild, 2005) (Magistrini, 2000).

En la tabla 1 se detallan las pruebas de evaluación microscópica y las estructuras evaluadas.

Pruebas Bioquímicas

El pH debe ser medido dentro de los 10 minutos de realizada la colecta. Si se demora la determinación la muestra dará un resultado menor por la producción de ácido láctico resultado del metabolismo espermático. Pueden utilizarse peachímetros o cintas indicadoras. El pH normal es 7,2 – 7,6. Un incremento del pH puede indicar la contaminación de la VA con detergentes, eyaculación incompleta, urospermia o inflamación.

La osmolaridad del plasma seminal es de alrededor de 336 +- 10,5 mOsm. En caso de urospermia este valor puede estar incrementado. (Ferrer, 2010)

Los niveles de fosfatasa alcalina, producida por los epidídimos y en menor medida por los testículos y ampollas es de 1640 a 48000 UI/L. Concentraciones < 90UI/L indican la presencia de azoospermia obstructiva bilateral.

La urospermia puede diagnosticarse por valores de concentración de creatinina en plasma seminal > 2mg/dl.

Por lo general sólo el pH es parte de la evaluación de semen de rutina, las demás determinaciones se realizan en casos específicos que lo ameritan.

Citología

Algunos padrillos tienen células redondas en sus eyaculados. Estas células pueden ser inflamatorias o germinales y deben identificarse en una citología. Para ello se realiza un extendido del semen y se tiñe con una tinción para células como la conocida comercialmente Tinción15 (Biopur, SRL. Argentina). Un conteo de más de seis neutrófilos por campo es indicativo de uretritis, adenitis vesicular, epididimitis u orquitis. (Estrada y col. 2007)(Ferrer, 2009)

Conclusión

La evaluación de semen se realiza generalmente con dos objetivos principales, como parte del examen de la aptitud reproductiva del padrillo y para determinar si el semen de un padrillo es apto para ser preservado (refrigerado o congelado; Magistrini, 2000).

Tradicionalmente la evaluación incluía la motilidad, morfología y la determinación del número total de espermatozoides del eyaculado. Pero con estas determinaciones no estamos evaluando la mayoría de los atributos seminales necesarios para la fecundación y desarrollo embrionario temprano. Hasta hoy no hay un único test para medir e incluso predecir la fertilidad masculina en el laboratorio, existen una batería de pruebas con diferente grado de correlación con fertilidad para evaluar una población espermática. En los últimos años se ha puesto mucho empeño en el desarrollo de pruebas de funcionalidad de los diferentes compartimentos del espermatozoide, un ejemplo es el uso de coloraciones fluorescentes o ensayos de unión espermática a la zona o hemi zona pelúcida. Estos últimos test mostraron tener buena correlación con la fertilidad del padrillo pero requieren de equipamiento sofisticado y costoso. (Rodríguez Martínez, 2006).

En la Tabla 1 se mencionan los diferentes compartimentos espermáticos y las pruebas de laboratorio que permiten evaluarlo. La explicación técnica de cada una de estas pruebas excede el objetivo de este capítulo y se sugiere recurrir a la bibliografía citada. (Magistrini, 2000; Neild, 2005; Rodríguez Martínez, 2006).

En conclusión, a medida que se progrese en la comprensión del funcionamiento del espermatozoide y paralelamente de los métodos para su evaluación, será posible aplicar estos avances a situaciones de la clínica diaria especialmente en el caso de individuos subfértiles.

Bibliografía

- Blanchard,T; Varner,D; Schumacher,J ; Love,C ; Brinsko, S; Rugby,S (2003) "*Semen Collection and Artificial Insemination*". En *Manual of Equine Reproduction*.(pp. 131-142).St.Louis: Mosby.
- Brinsko, S.(2012) "*Reproducción del padrillo atleta*". En Lossino, L. (comp.) Resúmenes de conferencias del III Congreso Argentino de Reproducción Equina. (pp 53-55). Buenos Aires: Sociedad Rural Argentina.
- Brinsko, S; Varner, D; Blanchard. (1993). "*Pharmacologic manipulation of the reproductive cycle*". En McKinnon, A; Voss, J; editor. *Equine Reproduction* (pp 334 -343) USA: Williams&Wilkins.
- Estrada, A; Samper, J. (2007). "*Evaluation of Raw Semen*". En Samper, J; Pycoc, J; McKinnon. *Current Therapy in Equine Reproduction*.(pp 253 – 257) Missouri, USA : Saunders, imprint of Elsevier.
- Ferrer, M. (2010). XXI Conferencias de Veterinaria Equina. AAVE. San Isidro. Argentina.
- Jasko, D. (1992) "*Evaluation of Stallion Semen*". En Turner,S; editor. *The Veterinary Clinics of North America: Equine Practice. Stallion Management*. Vol 8.Number 1. (pp129- 148). Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- Magistrini, M. (2000). "Semen Evaluation". En Samper, J. *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*.(pp 91-108) Philadelphia: Saunders Company.
- Mc Donnell, S. (1992) "*Normal and abnormal sexual behavior*" . En Turner,S; editor. *The Veterinary Clinics of North America: Equine Practice. Stallion Management*. Vol 8.Number 1. (pp71-89). Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- Neild, D.(2005). "*Evaluation of equine sperm membrana function: effect of cryopreservation*". Tesis doctoral
- Neild D, Chaves G, Flores M, Mora N, Beconi M, Agüero,A. (1999) "Hypoosmotic test in equine spermatozoa".*Theriogenology* 51, pp721-727.
- Neild D, Chaves G, Flores M, Miragaya M, Gonzalez E, Agüero,A.(2000) "The HOS test and its relationship to fertility in the stallion". *Andrología* 32, pp351-355
- Pickett, B.(1993). "*Collection and Evaluation of Stallion Semen for Artificial Insemination*". En: McKinnon, A; Voss, J; editor. *Equine Reproduction* (pp 705 -714) USA: Williams&Wilkins.
- Rodriguez – Martínez,H (2006) "*Can We Increase the Estimative Value of Semen Assessment?*".*Reproduction in Domestic Animals* 41.Suppl.2, pp 2-10.
- Rutter,B; Russo, A (2006). *Bases para la evaluación de la Aptitud Reproductiva del Toro*. Buenos Aires: Agrovet
- Tibary, A; Rodríguez, J. (2009) "*Causas y manejo de los desordenes eyaculatorios del padrillo*". En Lossino, L (comp) Actas del I Congreso Argentino de Reproducción Equina. (pp 129 - 133) Buenos Aires. Argentina

- Turner,R (2007) "*Urospermia and Hemospermia*". En Samper, J; Pycock, J; McKinnon. *Current Therapy in Equine Reproduction*. (pp 258-265) Missouri, USA : Saunders, imprint of Elsevier.
- Varner, D; Schumacher, J.(1998) "*Enfermedades del aparato reproductivo: el padrillo*" . En Colahan, P; Mayhew, I ; Merrit, A ; .Moore, J. *Medicina y Cirugía Equina*. (pp 773 - 886). Buenos Aires: Editorial Intermédica.
- Yates, D; Whitacre, M. (1993) "*Inseminación artificial en el equino*". En Van Camp, S, editor. *Clínicas veterinarias de Norteamérica. Practica equina. Reproducción*.(pp 173-192) Buenos Aires: Editorial Intermédica

Tabla 1: Pruebas de evaluación microscópica y las estructuras evaluadas

COMPARTIMIENTO ESPERMATICO		TEST DE LABORATORIO
C A B E Z A	MEMBRANA PLASMATICA	Eosina nigrosina/Eosina azul de anilina Coloraciones Fluorescentes(CDFA –PI / SYBR 14 –PI) HOS MET
	ACROSOMA	Tinción Spermac / Doble tinción/ Triple tinción MET Coloraciones Fluorescentes (CTC) Lectinas (PSA / PSA – FITC) Técnicas de anticuerpos monoclonales
	NUCLEO (ADN)	Análisis morfométrico Coloraciones Fluorescentes (PI) Pruebas de estructura de la cromatina SCGE
F L A G E L O	PIEZA INTERMEDIA	Coloraciones Fluorescentes (Rhodamine 123) Microscopía (DIC/ TEM/SEM/Contraste de Fase) Niveles de ATP intracelular (Bioluminiscencia) Determinación de AspAT en plasma seminal (Colorimetria)
	PIEZA PRINCIPAL	Evaluación de la motilidad (Microscopia de luz, Contraste de Fase, CASA)
	PIEZA FINAL	HOS

CDFA (Carboxyfluorescein Diacetate), PI (Propidium iodide), HOS (test hipoosmótico), MET (microscopia electrónica de transmisión), CTC (Clortetraciclina), PSA (Pisum sativum agglutinin), FITC (Fluorescein isothiocyanate), SCGE (single- cell gel electrophoresis), DIC (Microscopía de contraste de interferencia diferencial), SEM (Microscopía electrónica de barrido), AspAT (Aspartato Amino Transferasa), CASA (Computer Assisted Sperm)

Foto 1: Sala de Monta





Foto 2: Maniquí



Foto 3: Yegua preparada para la colecta



Foto 4: Protección



Foto 5: Protección para miembros posteriores

Tabla 2: Modelos americanos de vagina artificial



Modelo Missouri		1 Manguito 2 Parte Rígida 3 Colector 4 Bolsa colectora 5 Cobertor
Modelo Colorado		

Tabla 3: Modelos europeos de vagina artificial

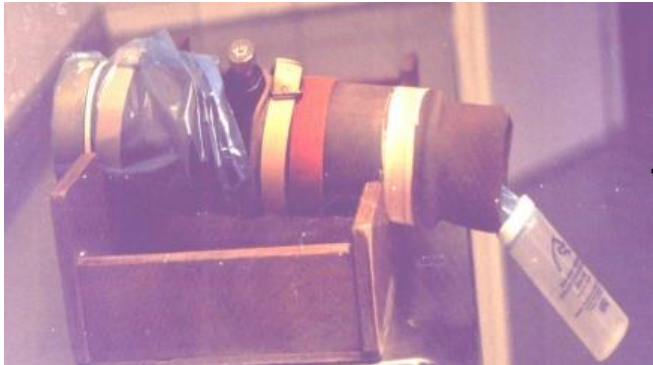
<p>Modelo INRA</p>		<p>1 Parte Rígida 2 Camisas 3 Cono 4 Bandas 5 Colector 6 Cobertor 7 Camisa descartable</p>
<p>Modelo Hannover</p>		



Foto 6: Colecta sobre maniquí



Foto 7: Filtrado

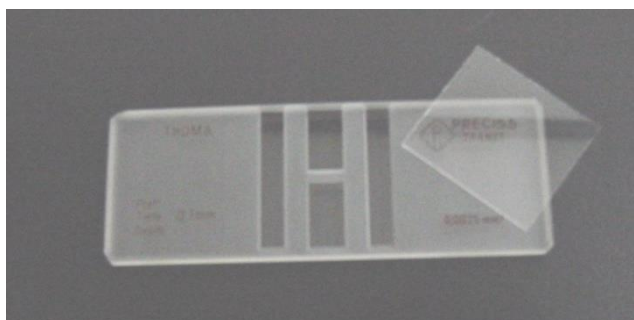


Foto 8: Cámara cuenta glóbulos

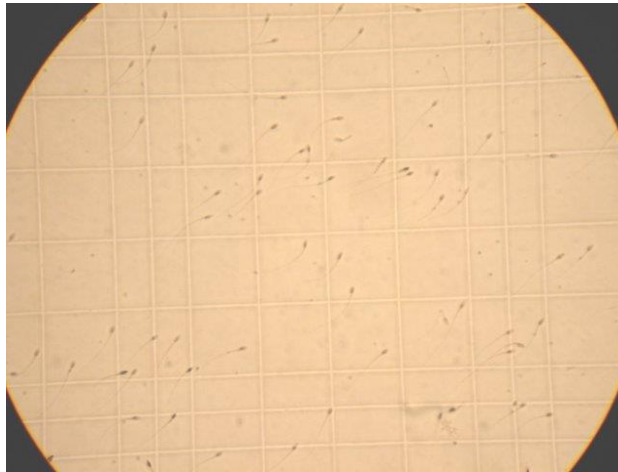


Foto 9: Retículo Cámara



Foto10: Test Hiposmótico

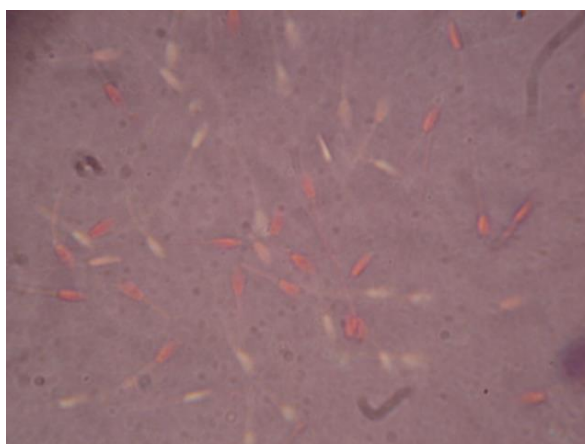


Foto 11: Coloración Eosina / azul de Anilina

SECCIÓN III

Porcinos



PARTE I

Anatomía y fisiología reproductiva

*Maricel Compagnoni, Valeria Fernández, Hernán Barrales,
Sara Williams*

CAPÍTULO 32

Anatomía reproductiva y examen del tracto reproductivo

*Maricel Compagnoni, Valeria Fernández, Hernán Barrales,
Sara Williams*

Aparato reproductor del verraco

Genitales externos

Escroto

El escroto es fácilmente identificable. Se sitúa en la región perineal no tan despegado del cuerpo del animal, por lo que, a diferencias de otras especies domésticas, este órgano es sensible a cambios de temperatura tanto ambiental como corporal, afectando también la temperatura testicular. Durante el examen clínico se debe considerar la inspección de este órgano, en busca de lesiones cutáneas que podrían comprometer la integridad testicular.

Testículos

Los testículos que descienden al día 90 de gestación, se ubican dentro del escroto, tienen forma elíptica, contornos lisos y una orientación oblicua caudo-dorsal. Se pueden evaluar mediante ultrasonografía a la palpación son blandos y en condiciones normales, deberían desplazarse con facilidad dentro de la bolsa escrotal, descartándose así adherencias.

Epidídimo

Este órgano está en íntima relación con el testículo, formado por un conducto epididimario largo y flexuoso envuelto por el mesoepidídimo. El epidídimo consta de tres partes anatómicas: cabeza, cuerpo y cola. Esta última, de grandes dimensiones, es fácilmente identificable en caudal del testículo dirigido dorso-medialmente, la misma está unida a la lámina parietal de la túnica vaginal por el ligamento de la cola del epidídimo. La cola del epidídimo es la única porción que es posible de examinar por palpación en el macho porcino.

Conducto deferente

En su origen es flexuoso y se sitúa medial al epidídimo. Se incorpora al cordón espermático y junto con él ingresa a la cavidad abdominal atravesando el canal inguinal. Ambos conductos deferentes confluyen dorsal a la vejiga, medial a los uréteres, sin llegar a formar una verdadera ampolla, como sí sucede en otras especies domésticas. Ambos conductos desembocan mediante los orificios eyaculadores en el colículo seminal de la uretra.

Prepucio

El prepucio tiene un orificio externo estrecho alrededor del cual existen pelos. Su cavidad es muy larga y está parcialmente dividida por un pliegue circular en dos partes, una caudal estrecha y otra craneal comparativamente más amplia. En dorsal de esta última hay una abertura circular que conduce al divertículo prepucial cuyas dimensiones varían según el animal. Esta abertura admitiría dos dedos en el animal adulto, aunque por lo general está cerrada por pliegues de membrana de recubrimiento. Dicho divertículo consta de dos amplias cavidades que acumulan líquido muy maloliente (esmegma) que se forma por la acumulación de orina y secreciones cutáneas en descomposición. Este líquido suele vaciarse durante la

cópula para lubricar el pene por acción del músculo prepucial craneal. También es reservorio de “feromonas”, sustancias odoríferas secretadas por el verraco.

Pene

El pene del verraco es fibroelástico, en el adulto mide de 45 a 50 cm de largo, tiene un asa sigmoidea preescrotal y su parte craneal (glande del pene) está retorcida en espiral, aunque dicha conformación es más evidente durante la erección. El orificio uretral externo tiene forma de hendidura y está situado ventrolateralmente. En cuanto a los músculos que se pueden identificar en el cerdo se encuentran el bulboesponjoso, que es muy fuerte pero corto, y el retractor del pene que se origina en el tercer o cuarto segmento sacro y se inserta en ventral del asa sigmoidea.

Genitales internos

Es importante aclarar, que en el cerdo todos estos órganos no se pueden evaluar durante un examen clínico de rutina, debido a la imposibilidad en la especie de realizar palpación rectal.

Cordón espermático

Este órgano está compuesto por: arteria testicular, plexo pampiniforme, linfáticos que acompañan las venas, plexo testicular de nervios autónomos, conducto deferente, haces de tejido muscular liso de los vasos y capa visceral de la túnica vaginal. El cordón se extiende desde el anillo inguinal profundo, atraviesa el canal inguinal y termina en el borde del testículo.

Glándulas accesorias

De craneal a caudal se encuentran las *glándulas vesiculares*, la *próstata* y las *glándulas bulbouretrales*.

Glándulas vesiculares, o vesículas seminales, son muy grandes y piramidales, se alojan casi por completo en la cavidad abdominal, en un animal adulto puede llegar a medir de 12 a 15 cm de largo por 5 a 8 cm de ancho, son de color pálido de estructura lobular y glandular, de cada una de ellas salen numerosos conductos que convergen en un único conducto excretor que desembocan en el colículo seminal a ambos lados de los orificios eyaculadores.

Próstata es la glándula accesoria que aporta la mayor proporción, alrededor del 50-75% de líquido seminal. Mide aproximadamente 2,5 cm de ancho. Consta de un cuerpo, parcialmente

oculto por las glándulas vesiculares, y una porción diseminada, infiltrada en las paredes de la uretra pelviana.

Glándulas bulbouretrales o de Cowper que tienen forma cilíndrica y se ubican a cada lado de las dos terceras partes caudales de la uretra pelviana. Miden 12 cm de largo por 2,5-3 cm de ancho. Están parcialmente cubiertas por una capa de músculo estriado (músculo bulboglandular) que contribuye con su vaciado. Estas glándulas son responsables de la producción y secreción de la porción gelatinosa del eyaculado.

Es importante aclarar que el crecimiento y desarrollo de las glándulas accesorias es un carácter sexual secundario, por lo que en animales prepúberes o castrados su tamaño es menor.

Evaluación de la Aptitud Reproductiva (EAR) del macho porcino

EAR: es el examen que realizamos para determinar si un animal es apto o no para la reproducción. Se debe realizar al menos dos veces al año y es necesario al inicio de la actividad y antes de entrar a producción.

Para su mayor comprensión se divide en los siguientes pasos:

- Reseña: indicar raza o línea genética, peso, edad e identificación,
- Anamnesis: son los antecedentes individuales y colectivos: origen, fertilidad, enfermedades, alimentación, alojamiento, planes sanitarios, tratamientos.
- Examen clínico general: estado general, frecuencia cardíaca y respiratoria, aparato locomotor, temperatura.
- Examen clínico particular: externo:
 - Testículos (forma, posición, tamaño, simetría, movilidad)
 - prepucio (piel, mucosa, orificio prepucial)
 - pene (tamaño, lesiones, deformaciones)
- Examen biológico: extracción y evaluación de semen: macroscópico, microscópico, bioquímico y sanitario.
- Examen funcional: etograma sexual, comportamiento social, prueba de libido,
- Examen sanitario del animal.
- Exámenes complementarios (ultrasonografía y pruebas bioquímicas)
- Informe y destino

Finalmente podremos definir si el animal es apto, no apto o diferido y en este caso determinar pronóstico y tratamiento.

Aparato reproductor de la cerda

Genitales externos

Vulva

Está constituida por dos labios gruesos, una comisura dorsal redondeada y una ventral angulosa. La fosa clitoridiana se haya 2 cm craneal de la comisura ventral. La vulva es el órgano que con más frecuencia se inspecciona con el fin de determinar subjetivamente si el animal está en estro, ya que su aspecto cambia siguiendo los niveles oscilantes de estrógenos en sangre, tornándose edematosa e hiperémica cuando estos llegan a su pico máximo preovulatorio.

Clítoris

Este órgano es largo y flexuoso; su glande forma una proyección puntiaguda sobre la fosa homónima.

Uretra

La uretra mide 7-8 cm de largo y en la hembra, tiene únicamente función excretora de orina. Desemboca en el piso de la vagina en el divertículo uretral. Esto último es importante tenerlo en cuenta al momento de la inseminación artificial (IA) para evitar dirigir el catéter hacia la vejiga; y aunque no es tan frecuente en esta especie, cuando se realizan maniobras como el sondaje vesical.

Glándulas mamarias

Las mamas se encuentran dispuestas en pares, dos torácicos, cuatro abdominales y uno inguinal. Pueden variar en número de 12 a 14 mamas según la hembra. En cerdas nulíparas la glándula mamaria consiste en brotes celulares distribuidos entre la grasa y tejido conectivo, mientras que en lactantes, el tejido conectivo es reemplazado en gran parte por parénquima glandular. La glándula está dispuesta en lóbulos formados por alveolos revestidos de células que secretan leche. Usualmente hay dos sistemas glandulares completos en cada mama, que

desembocan por separado en el pezón a través de dos orificios (Figura 1). El número de mamas es un aspecto importante a tener en cuenta a la hora de seleccionar reproductoras, ya que buscamos que nuestras futuras madres tengan el mayor número de mamas posibles, y sus pezones tengan la conformación adecuada para criar la mayor cantidad de lechones.

Genitales internos

Ovarios

Los ovarios se alojan dentro de la bolsa ovárica, conformada por el mesosalpinx, ligamento ovárico y mesovario. En animales prepúberes son redondeados y de bordes lisos mientras que en hembras que ya han tenido algún celo su superficie presenta prominencias irregulares correspondientes a folículos en diferentes estadios de desarrollo y cuerpos lúteos, los primeros varían en tamaño, siendo de 8 a 10 mm el diámetro para folículos pre-ovulatorios, y los cuerpos lúteos son un poco más grandes llegando a los 12 a 15 mm. Los ovarios se hayan ubicados en el borde lateral de la entrada a la pelvis, aunque su posición varía según el número de pariciones que haya tenido la cerda, pudiéndose encontrar a 2,5-5 cm del polo caudal del riñón correspondiente. Este órgano es inspeccionado comúnmente mediante ultrasonografía, pudiendo determinarse más objetivamente el día del ciclo en el que se haya la hembra.

Oviducto

Las trompas uterinas son largas, 15-30 cm de largo por 0,5cm de grosor. El mesosalpinx es la referencia inmediata para determinar su recorrido. Se describen tres porciones: el infundíbulo, la ampolla y el itsmo. Su extremo craneal, fimbriado tiene una gran abertura abdominal, mientras que su extremo caudal se fusiona insensiblemente con el cuerno uterino.

Útero

El útero consta de tres partes anatómicamente diferenciables. Un *cuello* o *cérvix*, un *cuerpo* y dos *cuernos*. El *cuello* alcanza una longitud considerable de 20-25 cm y se continúa directamente con la vagina sin crear proyección alguna dentro de la misma. Un aspecto llamativo del cérvix es la presencia de las *almohadillas cervicales*, que crean un sello efectivo para acceder al cuerpo del útero, los mismos se continúan hacia caudal con pliegues de la

mucosa vaginal. El *cuerpo* es la porción más pequeña del órgano, mide sólo 5 cm de largo. Por último, los *cuernos*, de 1,2-1,5 m de longitud, son flexuosos y muy móviles debido a la gran extensión del ligamento ancho. La extremidad tubárica de los cuernos se adelgaza para unirse de forma insensible con el oviducto. El útero no gestante se proyecta en el tercio caudal del abdomen, por su aspecto recuerda al intestino delgado; por otro lado en hembras gestantes descansa sobre el vientre por el peso de los fetos.

Vagina

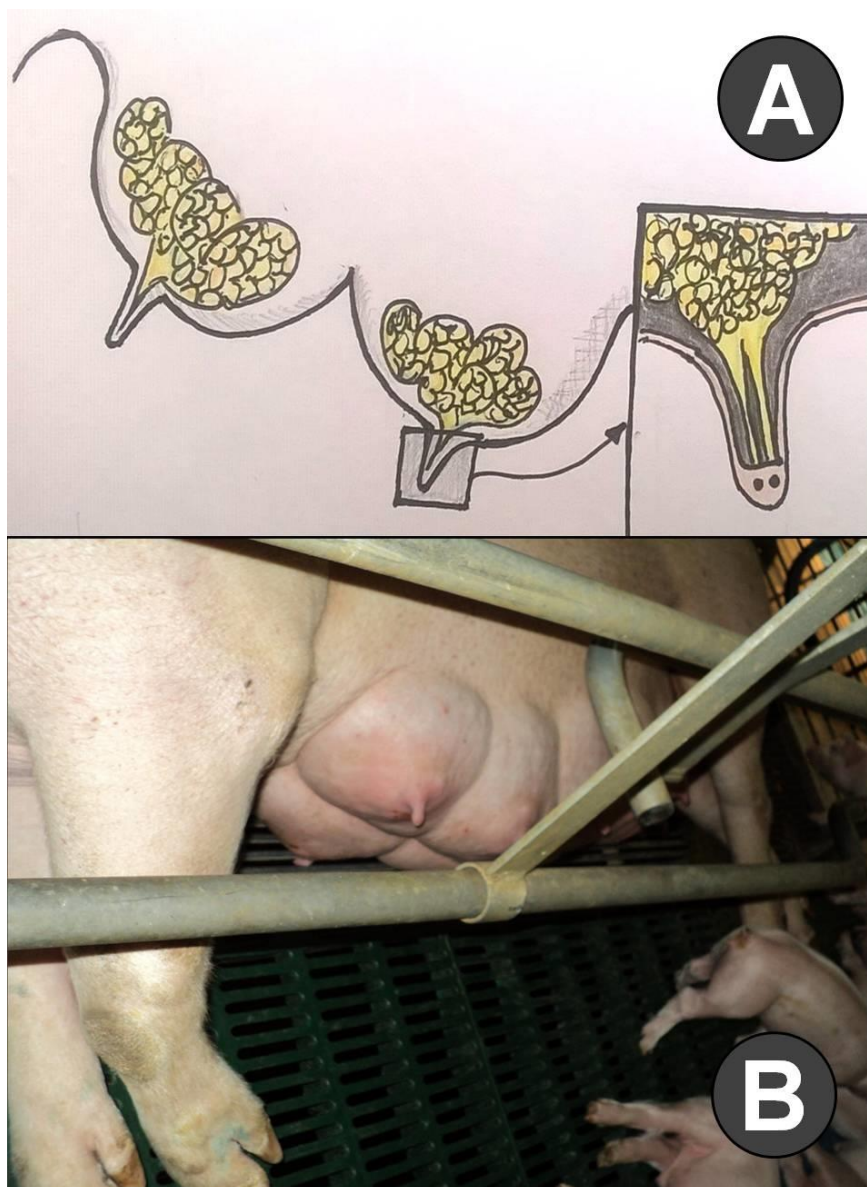
Este órgano histológicamente está conformado por dos capas de fibras musculares circulares entre las cuales se encuentra una capa de fibras longitudinales recubiertas por una capa mucosa. Su tamaño varía según el animal, en una cerda de mediana llega a medir 10-12 cm de largo.

Vestíbulo vaginal

El vestíbulo vaginal se extiende desde el orificio uretral externo hasta la vulva. Mide en promedio 8-12 cm de largo y en el piso se encuentran la desembocadura de las glándulas vestibulares menores. Tiene una dirección oblicua dorso-craneal, que es importante tener en cuenta cuando se realizan maniobras reproductivas.

Bibliografía

- Jeffrey J. Zimmerman, Locke A. Karriker, Alejandro Ramirez, Kent J. Schwartz & Gregory W. Stevenson (2012) *Diseases of Swine*. (10th ed.). Chichester: John Wiley & Sons, Inc
- F. Gil Cano, G. Ramírez Zarzosa, M^a.D. Ayala Florenciano, O. López Albors, R. Latorre Reviriego, F. Martínez Gomariz, C. Sánchez Collado, A .Arencibia Espinosa, M. Orenes Hernández, J.M^a. Vazquez Autón. (2012).“Anatomía interactiva del cerdo” (Apunte de catedra). *Interactive Pig Anatomy* [en línea]. Consultado el 19 de Febrero del 2015 en <http://www.um.es/anatvet/interactividad/ingles/pigs/Anatom%EDa%20Interactiva%20del%20Cerdo.pdf>
- Sisson S., Getty R. y Grossman J.D. (1885) *Anatomía de los Animales Domesticos*. (5ta Ed.) Barcelona: Masson.



Referencias:

- A. Esquema de que muestra la conformación de "cáliz" que debe buscarse en una glándula mamaria y la desembocadura de los dos conductos en el pezón.
- B. Foto de una glándula mamaria de conformación ideal. Obsérvese el gran desarrollo glandular y el buen tamaño de pezón.

CAPÍTULO 33

Fisiología del ciclo estral de la cerda

*Valeria Fernández, Hernán Barrales, Maricel Compagnoni,
Sara Williams*

La hembra porcina es desde el punto de vista reproductivo, poliéstrica continua, con un ciclo regular que dura en promedio 21 días.

Los ciclos estrales son interrumpidos en cerdas durante la lactancia y con anestro patológico.

Para su mejor comprensión el ciclo estral se divide en una fase folicular, con una duración de 5 a 7 días y una fase luteal, de 14 a 16 días. En esta última fase, se distinguen los períodos de metaestro y diestro y en la fase folicular, los períodos o estadíos de proestro y estro. Es importante mencionar que en esta especie la ovulación ocurre en el último tercio del estro.

Pubertad

La pubertad es el inicio de la actividad sexual, marcado por la aparición del primer celo, éste ocurre entre los 150 y 210 días de edad, con un peso aproximado de 85 – 90 kg.

Numerosos factores afectan la aparición de la pubertad, entre ellos podemos citar:

- Edad
- Peso

- Nutrición
- Factores genéticos
- Influencias climáticas
- Ambiente social
- Stress
- Efecto macho

La pubertad comienza desde el punto de vista endocrinológico cuando el hipotálamo pierde sensibilidad al influjo negativo de los esteroides ováricos y manifiesta las conductas de celo.

Se ha comprobado que las cerdas que conviven en grupo entran en esta etapa mucho más rápido que las que se mantienen aisladas, así como la introducción de un macho en un grupo de hembras pre púberes genera un pico de cortisol que tiene un efecto estimulante sobre las GnRH y entrada en la pubertad.

Ciclo estral

Un ciclo estral es el periodo que abarca desde un celo al siguiente. Se puede dividir en dos fases: luteal y folicular

El ciclo estral comienza con las manifestaciones de celo de la cerda, ocurriendo la ovulación hacia el final del estro. Luego, se inicia la fase luteal, que se prolonga hasta el día 14- 16 del ciclo, siendo éste el periodo en que está activo el cuerpo lúteo. Cuando éste regresa (luteólisis), comienza la fase folicular, en la cual se desarrollan y maduran los folículos hasta obtener el tamaño ovulatorio.

La regulación del ciclo está determinada por hormonas:

- Hipotalámicas: factores de liberación (RH, por sus siglas en inglés Releasing Hormones) que regulan las hormonas hipofisarias LH y FSH, inhibidoras y estimuladoras de PRL y oxitocina
- Hipofisarias: LH, FSH y PRL
- Ováricas: estrógenos y progesterona

La FSH es la hormona más importante para el desarrollo de los folículos ováricos, estos producen estrógenos, los cuales son responsables de las manifestaciones de celo.

Los estrógenos actúan sobre la hipófisis y estimulan la liberación de LH, cuando esta hormona llega a su pico máximo induce la ovulación.

Luego de la ovulación, las células de la granulosa y de la teca se luteinizan, dando la formación del cuerpo lúteo, con capacidad de producción y secreción de progesterona (P4) y esta es la hormona que prepara el útero para la anidación, si hay gestación los niveles de P4 se mantienen altos para mantener la preñez.

En caso de ausencia de fecundación, el útero secreta prostaglandina F2alfa, la cual destruye el cuerpo lúteo y disminuye los niveles de progesterona. Comienza nuevamente la estimulación de hormonas hipofisarias y se vuelven a reclutar folículos.

Fases del ciclo estral

Fase folicular o estrogénica

Esta fase se extiende desde el día 14-16 al 21 del ciclo

Se considera un **proestro**, de 2 a 4 días con crecimiento y maduración de folículos ováricos, estímulo de FSH, la LH se encuentra en alta frecuencia y baja amplitud, y comienzan a producir estrógenos.

Un **estro** de 40 a 70 horas, con un aumento en la concentración de estrógenos, manifestaciones claras de celo y un pico de LH que produce la ovulación aproximadamente a las 36 hs de iniciado el estro, la ovulación dura entre 2 y 4 horas.

Fase luteal

Comienza luego de la ovulación, y se extiende hasta el día 14-16 del ciclo.

Se considera un **metaestro** en el cual hay desarrollo del cuerpo lúteo y comienza la secreción de progesterona.

En el **diestro** ya el cuerpo lúteo es funcional, hay alta producción de progesterona, llegando un pico máximo entre 8 y 12 días, hay inactividad sexual.

Entre los días 14 y 16 hay regresión del cuerpo luteo con presencia de PGF2alfa

Estro

Es el periodo en el cual la hembra se torna receptiva al macho, con cambios anatómicos y comportamentales, por efecto de los estrógenos. Las manifestaciones secuenciales son: inquietud, monta a otras hembras, disminución de apetito, se observa enrojecimiento y edema de vulva, arqueamiento del lomo y lo más característico, una manifiesta quietud de monta, coincidente con el pico de estrógenos.

La duración del celo es en promedio 52 horas y se considera que en el último tercio del mismo se produce la ovulación, dato importante para programar la IA.

Dinámica folicular

El desarrollo folicular comprende tres procesos reclutamiento, selección y dominancia, a excepción de la cerda en la cual no hay dominancia. En la hembra porcina a diferencia de otras especies, no hay presencia de ondas foliculares, solo se aprecian durante el periodo prepuberal. El reclutamiento ocurre al comienzo de la fase y proliferan en la superficie del ovario unos 50 folículos con un diámetro entre 1 y 6 mm. En la selección el 25 % de ellos van a madurar alcanzando el estado preovulatorio, el resto se atresia.

En fase luteal se pueden observar entre 30 y 90 folículos de 1-2 mm y 30 a 50 de 2-7 mm, al final de esta fase la progesterona cae y aumenta la LH y FSH lo que conlleva al reclutamiento de los folículos más grandes. Los folículos pequeños tienen menor cantidad de receptores para esta hormona por ello se atresian.

Luego de la ovulación, la presencia del cuerpo regula negativamente la FSH y los niveles altos de P4, hacen que en la cerda no se describan ondas foliculares en la fase luteal.

Fisiología reproductiva macho porcino

Producción espermática

Los espermatozoides se forman en los testículos, su célula precursora es la espermatogonia que se multiplica, crece y madura. La multiplicación se inicia durante el desarrollo embrionario y la maduración comienza cuando el macho alcanza la pubertad. La maduración de los espermatozoides ocurre durante el pasaje por el epidídimo, lugar donde a través de diferentes transformaciones los espermatozoides adquieren la capacidad fecundante, y se almacenan en la cola del epidídimo.

La especie porcina presenta dos particularidades, la duración del servicio con variaciones de 3 a 15 minutos y el volumen del eyaculado que llega a los 500 ml, con un promedio de 200 ml. El semen posee una baja concentración de espermatozoides y gran cantidad de líquidos seminales (plasma seminal) producidos por la próstata y vesículas seminales y el material gelatinoso de las glándulas bulbouretrales.

Pubertad

La pubertad se presenta entre los 5 y los 8 meses de edad y debe desarrollar su libido y su capacidad de monta. Desde los 6 hasta los 18 meses el macho es considerado sexualmente maduro, los testículos crecen y la concentración y el volumen del eyaculado aumenta.

La libido depende de la actividad hormonal (testosterona) a nivel de SNC, pero también hay factores que influyen en su comportamiento sexual como: genética, medio ambiente, nutrición, sanidad e instalaciones.

El comportamiento sexual se puede evaluar a través de la libido, la misma calcula intensidad y frecuencia con que el macho busca y monta a la hembra.

En inseminación artificial se mide el tiempo que transcurre entre la entrada del macho a la sala de monta y que realiza el salto sobre el potro o súcubo, y el tiempo hasta el inicio de la eyaculación. Este tiempo puede variar en función de la estación en otoño e invierno tardan en promedio 4 minutos y en primavera y verano se duplica.

En el momento de la monta, son importantes ciertos actos del arco reflejo y estímulos que provoca el macho, siendo en orden de importancia, estímulos olfativos, auditivos, táctiles y visuales: el macho libera “feromonas” (a través de la orina y aumenta la secreción de saliva), emite un sonido característico (gruñidos o “canto de cortejo”), , olfatea, y realiza movimientos para comprobar la “quietud” de monta, ya sea de una hembra receptiva, o bien del caballete o potro de salto.

Bibliografía

- Amstrong, JD; Cox, NM y Britt, JH. 1986. Seasonal differences in function of the hypothalamic-hypophisial-ovarian axis in weaned primiparous sows. *J. Reprod. Fertil.*, 78: 11-20
- Kirkwood, R. N. y Giebelhaus, R .J. 1998. Day of injection does not affect the response of weaned sows to PG600. *Swine Health Prod.* 6:171-173.
- Knox, RV; Rodriguez-Zas, SL; Miller, GM; Willenburg, KL; Robb, JA. 2001. Administration of PG600 to sows at weaning and the time of ovulation as determined by transrectal ultrasound. *J. Anim. Sci.*, 79: 796-802
- Soede, N.M. 2000. Reproductive Management of pigs. Compact disc, Sus Multimedia Publications.

CAPÍTULO 34

Gestación en la especie porcina

*Sara Williams, Valeria Fernández, Maricel Compagnoni,
Hernán Barrales*

Fisiopatología de la gestación

Fisiología de la gestación

La eficiencia reproductiva es un objetivo importante en sistemas de producción animal y en la industria porcina, está representada por el número de lechones destetados por cerda por año. Además, la longevidad y el rendimiento en la vida reproductiva son esenciales para los productores de criaderos comerciales, ya que un mayor rendimiento y longevidad, reduce los costos de reemplazo y mejorar la rentabilidad. En este sentido, la edad al primer servicio puede ser un factor clave en determinar la longevidad y el rendimiento de toda la vida

La tasa de preñez en la especie porcina suele ser alta y bajo condiciones óptimas de producción (cuidados en la alimentación, alojamiento y sanidad) se consiguen tasa de ente el 85 y 95%. Las pérdidas embrionarias pueden llegar a ser de entre 20% y 30% de potenciales embriones (como se refleja por el número de cuerpos lúteos) que mueren durante los primeros 30 días de gestación y otro 10% muere antes de término. Parece que en la mayoría de los casos, la muerte del embrión ocurre entre los días 13 y 20,7 que alguna proporción de muertes

de embriones es debido a las aberraciones cromosómicas y defectos congénitos letales que son inevitables.

Los embriones migran a los cuernos uterinos en el lumen uterino desde el oviducto en el día 4, y el crecimiento está respaldado por el histotrofo materno. Los embriones comienzan a secretar estradiol entre los días 10 y 11 de vida embrionaria, coincidente con el rápido desarrollo hacia la fase filamentosa. Un segundo aumento de estradiol se produce después de los 14 días. La secreción de estradiol se asocia, entre otras cosas, a la secreción de proteínas específicas uterinas y la morfología de la célula epitelial uterina.

El reconocimiento materno de la preñez está dado por los niveles de estradiol “fetal” secretado por los embriones, que actúa sobre el endometrio materno, produciendo un cambio en la secreción de la prostaglandina F 2 alfa ($\text{PGF}_2\alpha$) la que es liberada al lumen del útero en lugar de pasar a la circulación sanguínea. De esta manera, hacia el día 12-14 post-servicio/IA en caso de que en los cuernos uterinos se encuentren al menos 4 embriones, la cantidad de estradiol “fetal” ejerce su efecto de reconocimiento materno de la preñez y evita la lisis de los cuerpos lúteos por la $\text{PGF}_2\alpha$.

Se ha demostrado que en razas de cerdos caracterizadas por la prolificidad, como la raza china Meishan, los blastocitos crecen más lentamente y secretan estradiol más gradualmente que en cerdas de razas occidentales. Como resultado, puede reducirse la competencia intrauterina por el espacio durante el período crítico de la distribución y el alargamiento de los embriones. Otra hipótesis se relaciona con el hecho de que en estas razas orientales, las ovulaciones más tardías dan lugar a embriones más pequeños y que la secreción de estradiol es en blastocitos más maduros.

Una mejor supervivencia embrionaria se consigue controlando la higiene al momento del servicio, mantener las cerdas en un ambiente fresco y tranquilo, y limitar el consumo de alimento a un nivel de mantenimiento de 2 a 5 días después del servicio/IA.

Aunque el tamaño de camada (prolificidad) depende mayoritariamente de la tasa de ovulación, la supervivencia fetal depende de los complejos factores uterinos, siendo vital la influencia de la capacidad uterina. La capacidad uterina puede implicar varios mecanismos, incluyendo el tamaño físico de la hembra, grado de plegamiento entre los tejidos uterinos y placentarios y la vascularización de la placenta.

Según la especie, existen diversos tipos de placenta que varían por su constitución y tipo de capas celulares que se interponen entre la sangre de la madre y el embrión. En el caso de la especie porcina la placenta es epiteliocorial y no invasiva debido a que permanecen todas las capas histológicas de la barrera placentaria durante la preñez; por eso también se la considera decidua, ya que no hay pérdida de tejidos uterinos y por lo tanto son mínimas las hemorragias al momento del parto. Es de tipo plegada porque el saco coriónico emite pliegues macroscópicos (pliegues primarios) que se interdigitan con estructuras complementarias del lado endometrial. De los pliegues primarios surgen pliegues secundarios que son las

vellosidades. Es difusa porque las vellosidades se distribuyen regularmente en toda la superficie del corion proporcionando una amplia área feto-materna de intercambio.

Anatómicamente hablando podemos distinguir claramente en la placenta porcina tres regiones: una zona embrionaria, ubicada en el centro del corion y que contiene al embrión propiamente dicho rodeado por la membrana corio-alantoidea, una zona paraplacentaria, que incluye membranas extraembrionarias y se encuentra a ambos lados de la región embrionaria y los extremos avasculares o apéndices necróticos, denominados así porque carecen de vellosidades y vascularización, y su función es sellar la unidad feto-placentaria y separarla de las placentas adyacentes. Además, existen a lo largo de toda la superficie placentaria distribuidas de manera bastante uniforme, alrededor de 8500 estructuras especializadas conocidas como aréolas, éstas son prominencias proliferativas del trofoblasto que están enfrentadas a cavidades de las glándulas uterinas. Hay aréolas regulares e irregulares y son discernibles histológicamente a partir del día 15 de gestación.

Por eso en la placenta porcina histológicamente encontramos 2 zonas: la zona areolar conformada por estas estructuras que permiten la nutrición histiotrófica a través del trofoblasto fetal, y la zona interareolar, en donde el epitelio endometrial y el trofoblasto se encontrarán interdigitados por sus microvellosidades, zona de íntimo contacto feto-materno y responsable de la nutrición hemotrófica.

Este tipo de placenta presenta de común con la de los rumiantes que el saco alantoideo no cubre el saco amniótico en la parte dorsal. A pesar de la proximidad y fusión del corion, y a veces del alantoides entre varios complejos fetales, no tiene lugar la unión “vascular-transmisión sanguínea” de un feto a otro. Las vellosidades de la cerda se diferencian de las de la yegua en que son mucho más finas y no presentan la disposición microcaruncular. El diámetro que alcanzan es de 0,3 mm.

La placenta porcina actúa como importante órgano inmunoendócrino durante la gestación produciendo hormonas como el estrógeno, que interviene en el establecimiento de la preñez y aumenta la producción de factores como los del crecimiento (insulina 1 y 2), progesterona, citoquinas y moléculas bioactivas. También participa en el intercambio de gases, nutrientes y metabolitos y por su contenido de líquido posee función defensiva frente a traumatismos, agentes bacterianos y virales (Vallet y col., 2001).

El proceso de placentación incluye el establecimiento de los vasos sanguíneos en los tejidos mamaros y fetales (Reynolds y Redmer, 1995). Alrededor del día 15 de gestación la red de la vascularización endometrial se vuelve distendida y más densa, hacia el día 32 se desarrolla una combinación de circulación feto-materna y circulación contracorriente. Las membranas embrionarias crecen rápidamente desde el día 20 al día 60 de la gestación, pero luego este ritmo declina, al punto que en el día 70 la placenta y el embrión son equivalentes en peso. La placenta estabiliza su crecimiento en ese momento, a diferencia del feto que sigue creciendo en forma exponencial hasta el momento del nacimiento (Vallet y col., 2001).

Bienestar. Sistemas de alojamiento

Las condiciones de alojamiento de las cerdas gestantes varían en gran medida, y pueden ser a tiempo completo ubicado en jaulas individuales (Foto 1) o en grupos pequeños (4-5 cerdas) o tamaños muy grandes (hasta 250 cerdas). Estas variedades de alojamiento son debido a problemas de bienestar de cerdo, que se están convirtiendo en una preocupación en todo el mundo. El tamaño del grupo, además de los sistemas de alimentación para cerdas gestantes también varían en gran medida: en general, las cerdas tiene alimentación restringida durante la gestación, pueden ser alimentados mediante alimentadores especiales (goteo o alimentadores electrónicos, Foto 2), recibir alimento húmedo o seco y pueden comer juntas o individualmente.

Diagnóstico de gestación

Metodologías

La productividad de una explotación porcina depende en gran medida de la eficiencia reproductiva, donde el número de lechones destetados, las camadas por cerda por año y la cantidad de días no-productivos (DNP) influyen considerablemente. La detección temprana de cerdas vacías permite disminuir los DNP y por lo tanto mejorar la eficiencia reproductiva. En forma rutinaria, la preñez se diagnostica con la ausencia de celo (no-retorno) a los 21 ± 3 días post-servicio o inseminación artificial. En producción porcina cada vez es más frecuente el uso de otros métodos para la confirmación de la preñez, con el propósito de identificar de una manera precoz y certera las hembras no preñadas, ya que la no-identificación de cerdas vacías disminuye considerablemente la eficiencia reproductiva. Esto incluye el uso de equipos basados en el efecto Doppler, ultrasonido del tipo A (de “amplitud”) y tipo B (de “brillo”), esta última conocida como ultrasonografía en tiempo real o ecógrafo de pantalla.

Alcances

La confirmación de la preñez mediante el uso de métodos complementarios, varía según el equipo utilizado. Los métodos más comúnmente utilizados son el ultrasonido tipo A, pudiéndose realizar el diagnóstico recién a partir de la cuarta o quinta semana post-servicio/IA. Sin embargo, con el ecógrafo de pantalla (ultrasonido tipo B), la confirmación de la preñez es precoz, ya que a los 21 días posteriores a la cubrición, pueden observarse imágenes compatibles con vesículas embrionarias, indicativas de gestación.

Controles gestacionales

Manejo nutricional

La función reproductiva está supeditada a las reservas proteicas o sus equivalentes metabólicos y no a las reservas adiposas. El ascenso de peso magro durante la gestación podría acrecentar la producción de leche, mientras que el de lípidos podría comprometer la ingesta durante la lactación.

Los partos de mayor productividad son del 3° al 5°. Hay una significativa pérdida de potencial reproductivo y costo financiero al remplazar cerdas por nulíparas de reposición. La hembra de reposición debe producir de 3 a 4 camadas para pagar el costo del reemplazo.

Después del destete, las primíparas y secundíparas destinan en forma selectiva los nutrientes al tejido magro a expensas del adiposo. Como las cerdas consumen menos y siguen creciendo, sólo consiguen la masa proteica apropiada en el 2° estro post-destete (y no en el primero). La pérdida de proteínas durante la lactación podría tener más relevancia que la de lípidos en el rendimiento reproductivo posterior. Cuando los aportes proteicos y de aminoácidos no cumplen con los requerimientos de mantenimiento, crecimiento y lactación, las cerdas movilizan sus reservas, que constituyen del 25-30% del total y provienen del músculo esquelético.

Objetivos de la alimentación durante la gestación:

- Maximizar la sobrevivencia de los embriones
- Incrementar el peso durante la gestación: 36-45 kg en el 1° parto; 35 a 40 kg de 2° a 5° parto y 25 kg a partir de 6° parto
- Mantener la condición corporal
- Asegurar alto consumo durante la lactancia
- Asegurar un parto normal, peso adecuado y sobrevivencia de los lechones
- Alimentación durante la gestación: tres fases:
- Fase 1: preñez temprana (0 a 2 semanas) Debe asegurar sobrevivencia de embriones e implantación. Es importante mantener niveles de progesterona adecuados, los que se relacionan con una reducción en la ingesta.
- Fase 2: de 3 a 13 semanas: de desarrollo corporal y recuperación de tejidos movilizados, adecuar el aporte según condición corporal de la cerda.
- Fase 3: preñez avanzada: crecimiento exponencial de tejido fetal y glándula mamaria. Aumentar la ingesta de alimento, ya que se incrementa la demanda, por aumento de la retención de nitrógeno en los productos de la concepción y la ubre.

Cuando la cerda se traslada del alojamiento de gestación a la sala de maternidad, se aconseja aportar fibra en la ración, que asegure: mayor tránsito gastrointestinal, facilidad en el parto y disminución de la posibilidad de que se desarrolle el síndrome mastitis-metritis-agalaxia (MMA)

Salud del neonato

El control de los recién nacidos, adquiere importancia económica en producción porcina, con el objetivo de reducir la mortalidad neonatal, que puede llegar a ser del 10 al 15%. En sistemas confinados, con control ambiental y la asistencia de los partos, esta mortalidad puede ser menor del 10% y sensiblemente mayor (llegando al 20%) en sistemas al aire libre, por efecto de las condiciones de temperatura o diseño de las parideras. Los principales factores que influyen en la sobrevivencia de los recién nacidos son la temperatura confort del neonato (30-32°C), la ingesta de calostro (fuente de energía e inmunidad pasiva) y evitar las pérdidas por aplastamiento. Si bien también hay factores propios del individuo (malformaciones congénitas o el “splay-leg”), los cuidados del neonato incluyen:

- Secado y eliminación de membranas fetales,
- Corte (si fuera necesario), ligadura y desinfección del cordón umbilical,
- Calostrado, asegurarse que el neonato ingiera calostro en las primeras horas post-nacimiento,
- Colocar al recién nacido cerca de una fuente de calor y al abrigo de cama (de paja o pasto seco, en caso de sistemas a campo)

Bibliografía

- Reynolds, L.P. y Redmer, D.A. (1995). Utero placental vascular development and placental function. *J. Anim. Sci.* 73: 1839-1851.
- Vallet, J.L.; Leysmaster, K.A.; Cassady, J.P.; Christenson R.K. (2001). Are the hematocrit and placental efficiency selection tools for uterine capacity in swine. *J. Anim. Sci.* 79 (2), 89.



Foto 1. Galpón de gestación y alojamiento de las cerdas en jaulas individuales



Foto 2. Sistema de alojamiento de cerdas gestantes en grupos, con alimentador automático e identificación electrónica

CAPÍTULO 35

Parto y puerperio en la especie porcina

*Hernán Barrales, Valeria Fernández, Maricel Compagnoni,
Sara Williams*

En la cerda la mantención de la gestación depende solamente de la producción de progesterona por parte del cuerpo lúteo, es decir, que si se produce la luteólisis, la misma se interrumpe desencadenándose un aborto o un parto dependiendo en qué momento se produzca. La duración de la gestación varía levemente entre razas, con una duración promedio de 114 ± 2 días.

Control endócrino del parto

El estímulo para el desencadenamiento del parto proviene del feto por la secreción de corticoides fetales, los cuales estimulan la síntesis y liberación de agonistas uterotónicos como ser la prostaglandina $F_2\alpha$ ($PGF_2\alpha$), la oxitocina, la prolactina y la somatotrofina. En la cerda al igual que en otras especies el parto posee tres fases:

Fase preparatoria

Comienza de 7 a 10 días preparto con el desarrollo de las glándulas mamarias. Los signos inminentes de parto más importantes son: inquietud, anorexia y cuando paren en corrales o al aire libre prepara el nido (2 a 3 horas antes del parto). La bajada de la leche que comienza dentro de las 2 horas previas al parto y la salida de líquido sanguinolento por la vulva, anuncia la salida del primer lechón. Los signos secundarios son la hiperemia de la vulva, aumento de la temperatura corporal y de la frecuencia respiratoria.

Es importante poder identificar estos signos ya que son útiles para determinar el momento en que comenzará la expulsión de los lechones para poder asistirlos con el objetivo de reducir la muerte perinatal.

Fase de expulsión

Es la fase donde se produce la expulsión de los lechones, en la misma la cerda se posiciona en decúbito lateral y se abstrae de su entorno. Los lechones son expulsados mediante contracciones alternadas de los cuernos uterinos y mediante la contracción de los músculos abdominales, estos últimos denominados pujos. El alantocorion y el amnios se rompen a pasar el feto por el canal del parto, pero pueden salir envueltos en el amnios.

La presentación de los lechones es anterior o posterior, posición dorsal y con los miembros torácicos y pelvianos flexionados hacia atrás. Debido esta presentación y la forma cilíndrica de los lechones los problemas de distocia en la cerda no son frecuentes. Solo se observa distocia cuando las cerdas son servidas con bajo peso y edad, donde el canal de parto no se ha desarrollado totalmente.

En una hembra politoca, como es la cerda, la duración de esta fase es de vital importancia y debe ser de 2 a 4 horas ya que si se prolonga demasiado los últimos lechones de la camada presentarían anoxia y un mayor riesgo de muerte perinatal. Es así que el intervalo entre lechones debe tener una duración máxima de 10 a 15 minutos.

Fase de expulsión de membranas fetales

En la cerda a diferencia de otras especies esta fase ocurre junto con la fase de expulsión. Los lechones pueden ser expulsados envueltos en sus membranas o bien salir varios sin

envolturas y luego se expulsan varias placentas a la vez. La placenta generalmente se expulsa en forma de dos o tres masas unidas por los cordones umbilicales.

Puerperio

La involución uterina comienza inmediatamente después del parto. Esta es más pronunciada en la primera semana y luego se enlentece. Alcanzado la involución total del útero entre los días 21 a 28 postpartos.

Los principales cambios de la involución ocurren en los primeros 10 días, es por esto que si una cerda es destetada antes de los 21 días no debe ser servida en su primer celo, ya que las probabilidades de quedar preñada son muy reducidas.

Durante el período post-partal (y de lactación para las cerdas) ocurren una serie de fenómenos endocrinológicos, que se podría agrupar en (Britt, 1996):

- Fase hipergonadotrófica: esta fase termina 2 a 3 días postparto debido a que el amamantamiento suprime la secreción de GnRH. El peso y longitud del útero involuciona en 2 a 3 días.
- Fase de transición: del día 3 al 14, con menor capacidad de los estrógenos en desencadenar una onda de desarrollo folicular. El útero sufre una involución rápida y restablece su peso y longitud en 14 días.
- Fase de normalización: se recupera la capacidad de los estrógenos en producir una ola de LH y la involución del útero es completa.

Aplicaciones

Inducción del parto

Al depender solamente del cuerpo lúteo la gestación en la cerda puede ser interrumpida por una dosis externa de PGF2 α . Es por esto que puede inducirse el parto para que éste ocurra en fecha determinada y en horario laboral con el objetivo de planificar el trabajo y asistir a la cerda.

Es importante tener en cuenta que el parto no puede ser inducido antes del día 112 de gestación porque sino produciríamos un aborto iatrogénico ya que los lechones aun no son viables. De este dato se desprende la importancia de los registros reproductivos, ya que si no conocemos la fecha exacta de servicio es imposible saber a partir de qué momento podemos inducir a la cerda.

Para la inducción existen productos comerciales que contienen PGF2 α natural de síntesis o análogo (cloprostenol). La aplicación puede ser en el labio vulvar o intramuscular. La dosis es de 175 μ g y desencadena el parto dentro de las 24 a 36 hs de aplicado.

Asistencia del parto

Luego de la inducción es importante que el operario sea entrenado en reconocer los signos de parto inminente, para poder asistir a la cerda en el momento correcto.

Los objetivos de la asistencia al parto son:

- Recibir y asistir al neonato.
- Reducir al máximo posible la duración de la fase de expulsión.
- Reducir al máximo el periodo nacimiento-primer calostroado.
- Asegurarse el calostroado de todos los lechones de la camada.
- Reducir la mortalidad perinatal.

En la mayoría de los casos en la cerda la fase de expulsión ocurre sin dificultades. Solo en caso de que se prolongue demasiado el parto o el intervalo entre lechones, está permitido aplicar un agonista uterotónico (oxitocina) o introducir la mano en el canal del parto para extraer los lechones (Figura 1). A continuación se enumeran los puntos a tener en cuenta a la hora de asistir un parto.

Se debe registrar:

- Hora de expulsión de todos los lechones, controlando que el intervalo sea de 10 a 15 minutos. Si el mismo supera los 20 minutos y la cerda no puja puede considerarse la aplicación de oxitocina (dosis máxima de 5 UI totales) o la extracción manual del lechón.
- Expulsión de la placenta (si o no),
- Cantidad de lechones nacidos totales, vivos, muertos y momificados,
- Cantidad de machos y hembras,
- Peso de la camada (luego del calostroado),

Asistencia y calostroado de lechones

Como se mencionó otro de los objetivos de la inducción es asistir y asegurarse el calostroado de los neonatos. Con este propósito la técnica de calostroado segregado es una de las más usadas. A continuación se describe dicha técnica y se enumeran los cuidados básicos del neonato.

Cuidados de neonato

- Al ser expulsado deben retirarse las envolturas fetales de la zona de la nariz para facilitar la respiración.

- En caso de que no respire se puede estimular al lechón con masajes en ambas parrillas costales.
- No debe cortarse el cordón umbilical. De tener que hacerlo, cortarlo en el extremo más cercano a la madre para evitar la hemorragia.
- Ligado y desinfección del cordón umbilical. La desinfección debe realizarse con tinta de yodo al 50%. El ligado se realiza con hilo de algodón y debe ajustarse hasta que se observa un halo blanco alrededor del nudo (Foto 1).
- Colocar al lechón en una fuente de calor y/o al abrigo de una cama de paja o viruta. La temperatura ideal en las primeras horas es de 35 a 37 grados centígrados.
- Calostrado de los lechones. Asegurarse que los lechones calostren posicionándolos en la mama (Foto 2).

Técnica de calostrado segregado

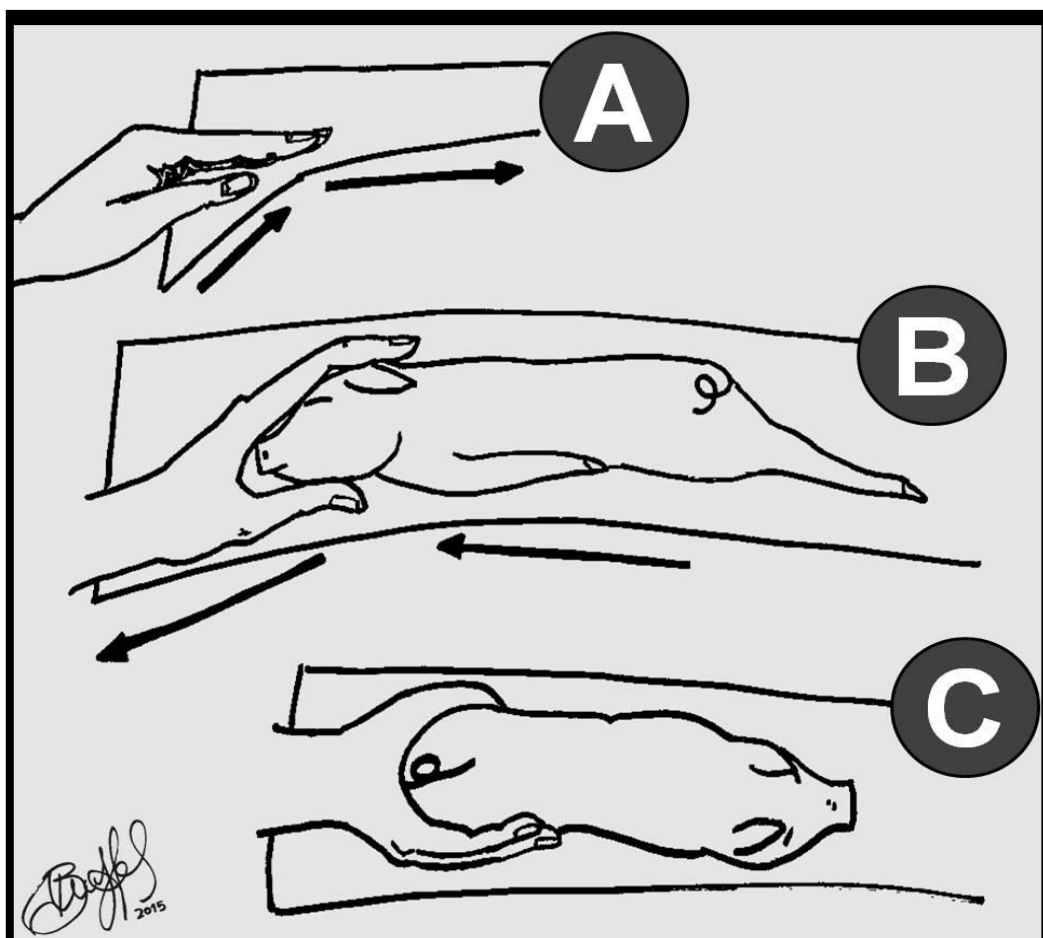
En la especie porcina los lechones que nacen primero suelen ser los de más peso y los dominantes de la camada. Los mismos consumen una mayor cantidad de calostro que los últimos.

La técnica de colostrado segregado tiene como objetivo obtener un consumo parejo de calostro en todos los lechones de la camada, a partir de la formación de dos grupos que se ponen a mamar de manera alterna.

El primer grupo se va conformado con los primeros nacidos (de 4 a 6 lechones), estos luego de ser secados se ponen a mamar. Conforme van naciendo más lechones se forma el segundo grupo. Luego de que los lechones del grupo 1 hayan calostrado se los retira a una caja con una fuente de calor para permitir que calostren los lechones del grupo 2. Dichos grupos se invierten 2 ó 3 veces y a partir de ese momento ya se puede ponerse a la camada completa a mamar.

Bibliografía

- Britt, JH. Biology and management of the early weaning sows. 1996. In Proceedings of the American Association of Swine Veterinarians (AASV):417-426
- Rutter B, Russo AF, autores. Fundamentos de la fisiología de la gestación y el parto de los animales domésticos. Buenos Aires, Editorial Universitaria de Buenos Aires; 2002.
- Hughes PE, Varley MA, autores. Reproducción del cerdo. Zaragoza, Editorial ACRIBIA; 1984. P. 109-113.
- Martinat-Botté F, Renaud G, Terqui M, Madec F, Costiou P, autores. Ultrasonografía y reproducción en cerdas. Paris, Intermédica; 2005. p. 74-76.



Referencias:

- A. Técnica para introducir la mano en el canal del parto: debe utilizarse guantes de tacto y tener las uñas cortas. La mano debe ponerse en forma de cuña, debe ingresarse primero con una dirección dorsal y rostral para sortear el piso de la pelvis y luego en línea recta como muestran las flechas. La mano debe ingresar cuando cesan los pujos de la cerda y sin hacer demasiada fuerza, se aconseja solo introducirla hasta la mitad de antebrazo.
- B. Extracción de lechones con presentación anterior: el dedo pulgar debe fijarse por detrás de la mandíbula y el resto de los dedos por detrás de la cresta de la nuca. La fuerza debe ser pareja y no excesiva. Primero se desliza el lechón en línea recta y cuando pasa por la pelvis hacia ventral como indican las flechas.
- C. Extracción de lechones con presentación posterior: los dedos deben fijarse por debajo del pliegue de la ingle y en el ilion. O bien pueden cruzarse los miembros pelvianos y fijar los dedos por encima del tarso. La fuerza y dirección es igual que para los de presentación anterior.

Figura 1. Técnica para la extracción manual de lechones.



Foto 1. Ligado correcto del cordón umbilical.



Foto 2. Operario realizando el calostro de un lechón.

PARTE II

Biotecnologías reproductivas

*Sara Williams, Valeria Fernández, Maricel Compagnoni,
Hernán Barrales*

CAPÍTULO 36

Manejo del ciclo estral en la cerda

*Sara Williams, Valeria Fernández, Maricel Compagnoni,
Hernán Barrales*

Aumento de la eficiencia de la hembra: inducción y sincronización de ciclos

Uno de los aspectos que más influyen en la eficiencia reproductiva de una explotación porcina es la suma de los días no-productivos (DNP) por cerda por año, que representan los días que la cerda no está ni gestante ni en lactancia. El intervalo destete-celo de una cerda, constituye uno de los factores más relevantes que actúan en el cúmulo de los DNP. Por este motivo la reducción del intervalo destete-estro (IDE) y destete-servicio fecundante (IDSF) es uno de los objetivos para reducir los DNP por cerda por año y aumentar la eficiencia reproductiva. Según Koketsu y col. (1997) las principales causas de infertilidad son la falla en la concepción (37.0%), anestro (25.2%), fallas en la gestación o cerdas que no llegan al parto (15.0%), hembras no-preñadas (1.4%) o negativas en el diagnóstico de gestación (14.0%) y aborto (7.4%).

Durante la lactancia, los estímulos mecánicos de los lechones en el amamantamiento y los altos niveles de prolactina, provocan un bloqueo para la liberación de la LH y la FSH. Sin embargo, ambas hormonas hipofisarias superan dicho bloqueo y hacia el día 14-21 post-parto comienza un aumento de sus niveles séricos, que inducen al desarrollo de folículos ováricos y

al aumento en la concentración de estrógenos. Debido a que durante la lactancia la secreción de las gonadotrofinas está inhibida y hay inactividad en el ovario, el uso de gonadotrofinas exógenas está indicado para la inducción de la actividad ovárica (Polge y col., 1968; Christenson y Teague, 1975; Koketsu y Dial, 1997; Estienne y Hartsock, 1998; Kirkwood y col., 1998; Wüst y Videla Dorna, 1998; Kirkwood, 1999; Estill, 1999; Bates y col., 2000; Kirkwood, 2001). Sin embargo, los trabajos son algo contradictorios y las diferencias de resultados podrían deberse a otros factores actuantes, como ser la estación del año, la paridad de la cerda, la genética, el alojamiento y el manejo (Knox y col., 2001).

Normalmente, con lactancias de 21 días, el celo ocurre dentro de los 7 días post-destete, sin embargo, distintos factores (como el aumento de la temperatura ambiental), provocan un aumento del intervalo destete-celo (IDE). El retraso en la salida en celo post-destete probablemente sea una manifestación como consecuencia de una alteración del eje hipotálamo-hipófisis, con disminución de los niveles de GnRH (gonadotrofina hipotalámica) y de la LH (Amstrong y col., 1986).

Efecto de la sincronización de celo en cerdas

El uso combinado de las gonadotrofinas coriónicas equina (eCG: equine chorionic gonadotrophin) y humana (hCG: human chorionic gonadotrophin) produce niveles séricos de LH y FSH, que normalmente ocurren luego del destete, y están indicadas para la inducción y sincronización de celo en hembras porcinas.

En otras especies animales que no sea la equina, la eCG tiene principalmente actividad FSH, y secundariamente LH, por lo cual estimula el crecimiento folicular y además induce el comportamiento estral y la ciclicidad. La acción de la hCG en muchas especies es LH, con una gran afinidad a los receptores de esa hormona. Su efecto es promover la ovulación y posterior luteinización de los folículos pre-ovulatorios.

Hay evidencias que los mejores resultados del tratamiento de eCG+hCG se obtienen en hembras tratadas en anestro o en fase folicular. Soede (2000) demostró que el 70% de las cerdas en anestro tuvieron celo luego del tratamiento con PG600® (Intervet), mientras que no hubo respuesta en cerdas en diestro (con cuerpo lúteo). Por lo tanto, en cerdas destetadas la mayor respuesta al tratamiento se consigue en fase folicular (primeros días post-destete), aplicando las gonadotrofinas a las 24 hs. o el mismo día del destete, sin que el día del tratamiento influya en las respuestas obtenidas (Kirkwood y Giebelhaus, 1998).

Uso de gonadotrofinas

En un estudio realizado en nuestro país se comparó la eficiencia reproductiva entre tres grupos de cerdas, uno control y dos tratadas con dos gonadotrofinas comerciales distintas (Wüst y col., 2004). Los resultados demostraron que con el uso de las gonadotrofinas al destete se logró el agrupamiento de celos y mejores resultados en la tasa de parición, en el parto siguiente. El número total de lechones nacidos y nacidos vivos fue mayor para las cerdas pertenecientes al grupo control (Williams y col., 2005). Estos resultados coinciden con los reportados previamente por Kirkwood y col. (1998), aunque difieren de aquellos que reportan que el uso de gonadotrofinas exógenas post-parto permite un aumento de la prolificidad (Lancaster y col., 1985; Kirkwood y col., 1995; Wüst y Videla Dorna, 1998; Vargas y col, 2001)

Uso de dispositivo intra-vaginal para el tratamiento del anestro en las cerdas

Otro de los métodos para la sincronización del celo en la cerda es el uso de progestágenos, sustancias con composición química y efecto similar a la progesterona (P4). Sin embargo, el uso de los progestágenos en la industria porcina, se limita actualmente a presentaciones a base de la progesterona sintética altrenogest (allyl trenbolone; 17-alpha-estratriene-4-9-11, 17-beta-ol-3-one) con administración oral durante 18 días. Si bien el producto es seguro y eficaz, cuando se administra en dosis menores a las indicadas (<13 mg por cerda por día) puede producir la aparición de quistes ováricos.

En otras especies animales, la administración de progesterona o pregestágenos para el tratamiento de la sincronización del estro, se realiza mediante la aplicación de dispositivos intra-vaginales. Si bien en la cerda hay muy pocos antecedentes del uso de estos dispositivos, se continua con las investigaciones que permitan determinar una concentración de hormona necesaria para la especie porcina, días de tratamiento y resultados al retiro del dispositivo.

Uso de progestágenos por vía oral en cerdas primíparas

En estudios recientes, se aplicó el tratamiento con progestágenos por vía oral (altrenogest o allil-trenbolona, Regumante®, Intervet) en cerdas primíparas al destete. El producto se administró el día previo al destete y se probaron tratamientos cortos, durante 7 días, o largos, por 15 días. Cuando se estudió el desarrollo folicular en cerdas tratadas, se observó que el

intervalo fase folicular–estro fue más corto ($P=0.005$) en animales tratados. El tratamiento no afectó la tasa de ovulación ni el desarrollo embrionario. Sin embargo, en animales tratados, el aumento en el tamaño folicular durante el tratamiento fue positivo con la tasa de ovulación ($P=0.05$) (van Leeuwen y col., 2010). En un estudio similar realizado posteriormente, se observó que los tratamientos cortos, son beneficiosos con cerdas con folículos pequeños al destete, y no así con aquellas que presentaban folículos grandes. En hembras primíparas que presentaban folículos grandes al momento del destete, los tratamientos largos fueron más beneficiosos, obteniendo además mejores resultados en la tasa de parición y prolificidad (van Leeuwen y col., 2011).

Bibliografía

- Amstrong, JD; Cox, NM y Britt, JH. 1986. Seasonal differences in function of the hypothalamic-hypophyseal-ovarian axis in weaned primiparous sows. *J. Reprod. Fertil.*, 78: 11-20
- Bates, RO, Kelpinski, J, Hines B, Ricker, D. 2000. Hormonal therapy for sows weaned during fall and winter. *J. Anim. Sci*, 78: 2068-2071
- Christenson, RK, Teague, HS. 1975. Synchronization of ovulation and artificial insemination of sows after lactation. *J. Anim. Sci.*, 41 (2): 560-563
- Estienne, MJ, Hartsock, TG. 1998. Effect of exogenous gonadotropins on the weaning-to-estrus interval in sows. *Theriogenology*, 49: 823-828
- Estill, CT. 1999. Current concepts in estrus synchronization in swine. *Proceedings of the American Society of Animal Science*: 1-9.
- Kirkwood, RN. 1999. Pharmacological intervention in swine reproduction. *Swine Health Prod* 7:29-35
- Kirkwood, RN. 2001. Using gonadotropins: combination of eCG (PMSG) and hCG. *Proceedings Workshop: Reproductive Pharmacology, 32nd Annual Meeting, AASV, Nashville, Tennessee (USA), February 24-27*:13-21
- Kirkwood, RN; Aherne, FX; Foxcroft, G. 1998. Effect of gonadotropin at weaning on reproductive performance of primiparous sows. *Swine Health and Production*, 6 (2): 51-55
- Kirkwood, R. N. y Giebelhaus, R .J. 1998. Day of injection does not affect the response of weaned sows to PG600. *Swine Health Prod.* 6:171-173.
- Kirkwood, RN; Soede, NM; Dyck, GW; Thacker, PA. 1995. The effect of immunoneutralization of PMSG at a gonadotropin-induced oestrus on the duration of ovulation and reproductive performance of sows. *J. Ani. Sci.*, 61: 321-324
- Knox, RV; Rodriguez-Zas, SL; Miller, GM; Willenburg, KL; Robb, JA. 2001. Administration of PG600 to sows at weaning and the time of ovulation as determined by transrectal ultrasound. *J. Anim. Sci.*, 79: 796-802
- Koketsu, Y; Dial, GD; King, VL. 1997. Returns to service after mating and removal of sows for reproductive reasons from commercial swine farms. *Theriogenology*, 47 (7): 1347-63
- Lancaster, RT; Foxcroft, GR; Boland, MP.1985. Fertility of sows injected exogenous estradiol and/or gonadotropins to control postweaning oestrus. *Animal Reproduction Science*, 8: 365-373
- Polge, C.; Day, B.N., Groves, T.W. 1968 Synchronisation of ovulation and artificial insemination in pigs. *Vet. Rec*, 83: 136-142
- Soede, N.M. 2000. Reproductive Management of pigs. Compact disc, Sus Multimedia Publications.
- van Leeuwen, JJJ; Williams, S; Kemp, B and Soede, NM. 2010. Post-weaning Altrenogest treatment in primiparous sows; the effect of duration and dosage on follicular development and consequences for early pregnancy. *Animal Reproduction Science*, 119: 258-264

- van Leeuwen, JJJ; Williams, S; Martens, MRTM; Jourquin, MA; Driancourt; Kemp, B and Soede, NM. 2011. The effect of different post-weaning Altrenogest treatments of primiparous sows on follicular development, pregnancy rates and litter sizes. *Journal of Animal Sciences*, 89: 397-403
- Vargas, AJ; Wentz, I; Bortolozzo, FP; Borchardt Neto, G; Silva, LE da; Kummer, R; Dallanora, D. 2001. Desempenho reprodutivo de primíparas suínas submetidas á terapia hormonal com eCG associado ao hCG. X Congresso EMBRAPA: 183-184
- Williams, S; Fernandez, V; Videla Dorna, I; de la Sota, RL. Eficiencia reproductiva en cerdas tratadas con gonadotrofinas al destete. 2005. VI Simposio Internacional de Reproducción Animal (IRAC). Realizado en la ciudad de Córdoba (prov. de Córdoba), 24 al 26 de junio de 2005. Trabajo presentado como poster y publicado en el Libro de Memorias
- Wüst, A; Videla Dorna, I. 1998. Eficacia de la utilización de una combinación de gonadotrofinas exógenas (eCG+hCG) en la inducción y sincronización de celos en cerdas nulíparas y multíparas. *AAPA*, 18 (1): 355.
- Wüst, A.; Williams, S., Videla Dorna, I.; Piñeyro, P.; de la Sota, RL. 2004. Reproductive efficiency in sows using two comercial gonadotropins at weaning. 15th International Congress on Animal Reproduction (ICAR) Realizado en Porto Seguro, Brasil, del 8 al 12 de agosto de 2004. Trabajo presentado como poster y publicado en los Proceedings, pp 106

CAPÍTULO 37

Recolección y evaluación de semen porcino

*Valeria Fernández, Hernán Barrales, Maricel Compagnoni,
Sara Williams*

Recolección

La obtención de semen puede realizarse por tres métodos: electro eyaculación, vagina artificial y presión manual.

Electro eyaculación: su uso está indicado en animales lesionados, de baja libido o mayores de gran valor (Gibson, 1983).

Vagina artificial: se crea un ambiente de temperatura y presión similar al tracto genital de la hembra, capaz de producir estímulos para provocar la eyaculación, es un método costoso y en el cual no se pueden dividir las fracciones.

Manual: es la más simple y económica, se obtiene un normal y completo eyaculado, el verraco monta sobre un potro o maniquí dejando al descubierto el pene, se lo toma y se ejerce presión en el glánde rítmicamente, simulando la presión ejercida por el canal cervical, luego de un tiempo que varía de segundos a 3 ó 4 minutos comienza la eyaculación.

El potro, maniquí o caballete debe tener el tamaño de una cerda, debe ser fácilmente lavable, la altura debe ser menor al del macho o ser regulable y debe ser cómodo, para evitar lesiones.

Es necesario para la extracción un envase de vidrio o plástico con capacidad de 500 ml, debe estar contenido en un termo que tiene la función de mantener la temperatura en 37°C y en la superficie del vaso se colocara una doble tela de gasa con una banda de goma para sujetarlo (Fuentes y Serrano, 1984), con la finalidad de retener la porción gelatinosa del eyaculado. Hoy existen bolsas de extracción comerciales que tienen incorporado el filtro.

El material utilizado en la recolección de semen debe estar limpio, esterilizado y atemperado.

Durante el eyaculado el esperma emite tres fracciones:

Fracción pre-espermática: formado por las secreciones de la próstata, vesículas seminales y pequeñas porciones de las glándulas bulbo-uretrales (Cowper), es transparente y tiene cantidad insignificante de espermatozoides.

Fracción espermática: tiene la mayor concentración de espermatozoides y también secreciones de glándulas vesiculares y próstata. El volumen varía de 40 a 100 ml y es el 30% – 50% del eyaculado y tiene una concentración media de 600.000 espermatozoides por mm³.

Fracción pos-espermática: posee poca cantidad de espermatozoides, está formado por secreciones de glándulas de Cowper y próstata, se ven los grumos gelatinosos.

En un servicio natural la función de la porción gelatinosa es formar un tapón en el cuello uterino para evitar el reflujo del esperma.

Evaluación de semen

En los centros de inseminación artificial se evalúa en forma rutinaria el volumen, la motilidad, la concentración y la morfología espermática.

La evaluación espermática se puede dividir en macroscópica y microscópica.

Evaluación macroscópica:

- Volumen: depende de la edad, raza, frecuencia de salto y condiciones ambientales. El volumen normal del eyaculado del macho adulto varía entre 125 y 500 ml, con un promedio de 200 ml. (Mckenzie ¿)
- Color: la primera fracción es muy transparente, la segunda fracción es blanca lechosa y la tercer fracción es blanquecina transparente y la porción gelatinosa es blanco grisáceo.

Se pueden observar contaminaciones con sangre, orina, secreciones prepuciales, pus, etc., y esto varia su color natural.

- Olor: es *sui generis*, en caso de contaminación con orina se verán modificaciones, aumento de volumen y pH alto.
- Densidad: está determinada por la concentración de espermatozoides del eyaculado. Alta concentración densidad alta y viceversa.
- pH: se debe evaluar inmediatamente después de la extracción, ya que hay variaciones en poco tiempo.

El pH de las glándulas seminales es ácido por la gran concentración de ácido cítrico. La secreción prostática tiene un pH ligeramente alcalino.

El pH del eyaculado varía entre 7 y 7,8 con una media de 7,4, ligeramente alcalino (Roberts, 1971)

Evaluación microscópica

- Motilidad: en el cerdo se evalúa solo motilidad individual microscópica, es una valoración subjetiva.

Se observa inmediatamente después de la recolección, se coloca una gota de semen puro (sin diluir) entre porta objeto y cubre objeto previamente atemperado y se determina el porcentaje de espermatozoides móviles.

- Vigor: evalúa la calidad de movimiento, se clasifica de 0 a 5 de la siguiente manera (Aisen & Venturino, 2004)

0: espermatozoides inmóviles o muertos

1: espermatozoides sin movimiento progresivo, girando sobre sí mismos.

2: espermatozoides con movimientos anormal o eventualmente progresivo

3: espermatozoides con movimiento progresivo lento y sinuoso

4: espermatozoides con movimiento progresivo muy rápido.

5: espermatozoides con movimiento progresivo energético.

- Concentración espermática: expresa el número de espermatozoides por ml o cm^3 , siendo en promedio de $300.000/\text{mm}^3$.

La concentración se determina con el uso de la cámara cuenta glóbulos, la más utilizada en porcinos es la de Bürker.

Se hace una dilución 1:100 en solución fisiológica formolada al 3‰ en un matraz aforado a 100 ml. Se coloca una gota en la cámara y se observa al microscopio y se cuentan los espermatozoides de 40 cuadrados.

- Formas anormales: se pueden contabilizar en la cámara de Bürker, se anotan las diferentes anomalías y luego se expresa el resultado en porcentaje.

Las formas anormales se clasifican en:

Primarias: ocurren durante la espermatogénesis, tienen relación con cambios cualitativos y cuantitativos del material nuclear y de los órganos de origen citoplasmático.

Secundarias: ocurren en el epidídimo o en el proceso de maduración del esperma, se desarrollan después de la formación, pueden producirse por procesos inflamatorios del testículo o de glándulas accesorias y por cambios de temperatura en el testículo.

- Vitalidad: mediante la coloración vital se evalúa integridad de membrana, si la misma está alterada permite el pasaje del colorante hacia el interior por lo cual se verá el espermatozoide teñido. Se utiliza eosina-nigrosina, la eosina es el colorante que tiñe el espermatozoide y la nigrosina es un colorante de contraste (Foto 1). Se coloca una gota de semen y una de colorante, se mezcla y luego de un minuto se extiende y se observa al microscopio, se cuentan al menos 100 células y se expresa en porcentaje
- Acrosomas normales: no es una evaluación de rutina, hay diferentes métodos, se puede utilizar la coloración de Wells y Awa y observarse en microscopio óptico, se puede utilizar PSA y observarse en un microscopio de fluorescencia o se puede observar en microscopio de contraste de fases. Su finalidad es evaluar la integridad del acrosoma, ya que es fundamental para que el espermatozoide sea fecundante.

Los valores mínimos que se exigen para considerar que el semen es de buena calidad y apto para inseminación artificial son los siguientes:

- Motilidad: >70 %
- Vigor: 3
- Concentración: 300.000 esp/mm³
- Formas anormales: 20% (primarias no mayores al 5% y 15% de secundarias)
- Vitalidad: 80%
- Acrosomas normales: 85% 48 horas posteriores a la extracción.

Bibliografía

- Cameron, R.D.A. 1987 "Sexual development and semen production in boars". *Pig News and Inform.* 8:389-396.
- du Mesnil du Buisson, F. y Dautier, E. 1958 "Maintien du pouvoir fécondant du sperme de verrat en présence du gaz carbonique". *C.R. Acad. Sci., Serie D* 247:2472-2475.
- Hooper, P.N.; Green, C.G.; Gray, J.; Goodman, S.; Walters, J.R. 1984 "Aspects of semen production in A.I. boars". *IPVS Congress*.
- Ito, S.; Niwa, T. y Kudo, A. 1948 "Studies on the Artificial Insemination in swine". *Research Bull Chiba Zotech. Esp. Stn.* 55:1-74.
- Johnson, L.A. 1998 "Current developments in swine semen: preservation, artificial insemination and sperm sexing". *Proceedings of the 15th IPVS Congress, Birmingham, England, 5-7 de julio*, pp 225-229.
- Kennedy, B.W. y Wilkins, J.N. 1984 "Boar, breed and environmental factors influencing semen characteristics of boars used in artificial insemination". *Can. J. Anim. Sci.* 64:833-843.
- Martín Rillo, S.; de Alba, C.; Fuentes, A.; Lapuente, S. y Corcuera, B.D. 1998 "Hands-free artificial insemination in swine". *Proceedings of the 15th IPVS Congress, Birmingham, England, 5-7 de julio*, pp 34.
- Marotta, E. 1973. "Extracción de semen en el cerdo: técnica y material". *Rev. Med. Vet.* 54:25-34.
- Nowak, R.; Paquignon, M. y Signoret, J.P. 1984 "Production spermatique et fertilité de verrats soumis a un rythme intensif d'éjaculation". *Ann. Zootech.* 33:353-366.
- Perez Marcos, C.; Sánchez, R.; Palacio, M.; Pursel, V.G.; Perez García, T. y Rillo, S.M. 1991 "Effects of dilution rate on the motility and acrosome morphology of boar spermatozoa stored at 15°C". *Reproduction in Domestic Animals* 26:112-116.
- Polge, C 1956 "Artificial insemination in pigs". *Vet. Record* 68:62-76.
- Weber, H. 1989 "Susceptibility of boar semen to cold shock. Effects of diluent, incubation and cooling rate". *Thesis, Hannover, GDR*, 103.
- Weitze, K.F.; Wagner-Rietschel, H.; Waberski, D.; Richter, L. y Krieter, J. 1994. "The onset of heat after weaning, heat duration and ovulation as major factors in A.I. timing in sows". *Reprod. Dom. Anim.* 29:433-443.
- Williams, S.; Marotta, E.; Lagreca, L. y Vales, L. 1991 "Variaciones de la calidad del semen del verraco según la frecuencia de montas". *Revista de Medicina Veterinaria* 72:288-294.
- Williams, S.; Marotta, L.; Lagreca, L. y Vales, L. 1992a. "Factores que afectan las características del semen del verraco". *Rev. Veterinaria Argentina IX (86)*:401-410.
- Williams, S.; Marotta, E.; Lagreca, L. y Vales, L. 1992b. "Conservación del semen porcino al estado fresco". *Rev. Therios* 19:362-377.
- Zavos, P.M. y Liptrap, D.O. 1987. "Procedures for collection, evaluation, dilution and artificial insemination of boar spermatozoa". *Agri. Practice* 8 : 19-23.

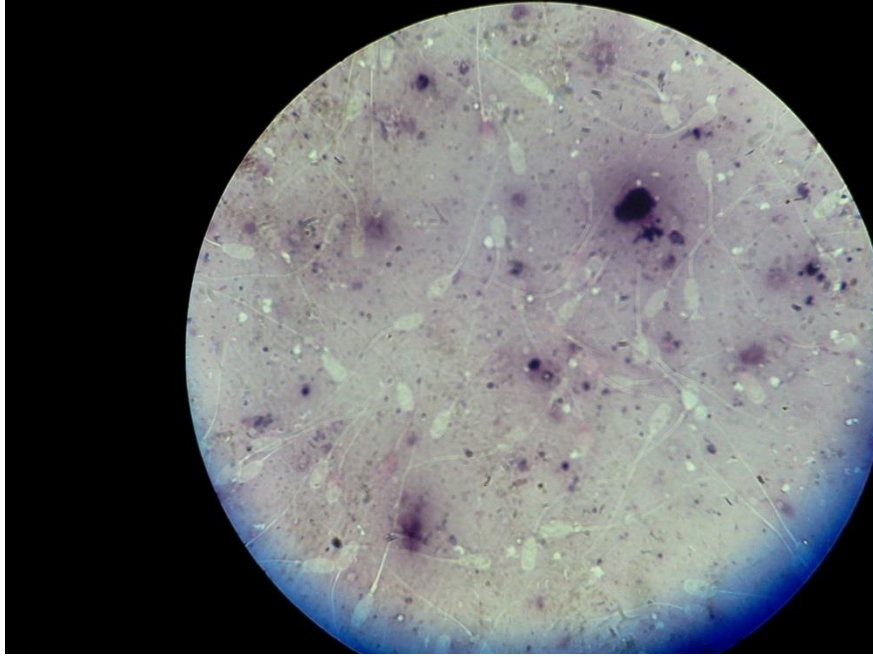


Foto 1. Tinción vital eosina-nigrosina de espermatozoides de cerdo

CAPÍTULO 38

Crioperservación de semen porcino

*Sara Williams, Valeria Fernández, Maricel Compagnoni,
Hernán Barrales*

Procesos de criopreservación seminal en porcinos

La criopreservación espermática es una biotecnología de gran trascendencia ya que tiene un papel relevante en la conservación y difusión de recursos genéticos.

La gran desventaja de la inseminación artificial con semen refrigerado (IAR) respecto a la inseminación artificial con semen congelado (IAC) es la limitación de la conservación de las dosis, siendo que en la primera se pueden mantener de 2 a 8 días. Esto lleva a que los centros de inseminación deban ofrecer una producción y reparto de dosis refrigeradas muy agilizadas; logrando un menor rendimiento en la utilización de los animales más selectos, debido a una limitación en el transporte de las dosis a grandes distancias, y una pérdida de un 10 a un 30% de dosis seminales por caducidad.

En el caso del semen congelado, su conservación podría ser permanente, permitiendo el intercambio de material genético a larga distancia y durante un período muy largo (años). Además, este período de tiempo puede ser crucial para efectuar un control sanitario o genético del semen antes de su uso.

La congelación permite la creación de bancos de semen; de interés evidente en el caso de la preservación de razas en peligro de extinción y de grandes posibilidades para la conservación de líneas o extirpes de especial interés. Esto es importante desde el punto de vista comercial para asegurar la conservación de líneas genéticas valiosas ante posibles situaciones desfavorables (epizootia, incapacidad para recogida, infertilidad/subfertilidad por altas temperaturas).

A nivel práctico permite introducir material genético de gran valor sin los riesgos derivados de la introducción de animales al establecimiento.

Los beneficios del uso de semen congelado son:

1. Una racionalización económica del eyaculado.
2. Realizar la recogida del semen solo en las épocas reproductivas más favorables.
3. El comercio internacional de dosis.
4. Mejor aprovechamiento de los verracos élite.
5. Mayor uniformidad de los animales producidos.
6. Suministro de material genético a granjas con dificultades de abastecimiento de semen fresco/refrigerado.

Como desventajas se pueden citar:

1. La reducida fertilidad y prolificidad de los espermatozoides criopreservados debido a los cambios estructurales y funcionales que sufren los espermatozoides durante el proceso de congelación,
2. La disminución de la funcionalidad que dichos espermatozoides tienen en el tracto genital de las cerdas;
3. Las peculiares características anatómicas del aparato genital de la cerda que dificulta a los espermatozoides el poder llegar al oviducto,
4. La mala calidad de los embriones producidos que condicionan su posterior viabilidad.

Las particularidades que tiene el espermatozoide del porcino hacen que sea muy sensible al choque por frío, que produce una alteración de funcionalidad de la membrana espermática y la viabilidad celular se ve comprometida. Esto provoca un acortamiento de la sobrevivencia del mismo y por ende de su período fértil. Se dice que sufren una precapacitación con disminución de su vida útil en el tracto genital de las hembras. A esto se le suma la característica de las hembras porcinas de tener un celo muy largo, con un período prolongado de ovulaciones en comparación con otras especies, dificultando más la fecundación y prolificidad logradas con semen congelado.

Uno de los problemas a solucionar es el mayor costo que presentan las muestras seminales congeladas, esto se debe a:

- El número de espermatozoides por dosis es sensiblemente mayor en el caso de semen congelado frente al refrigerado para asegurar unos buenos resultados reproductivos ($5-6 \times 10^9$

esp. vs $2-3 \times 10^9$ esp. respectivamente). Así de un solo eyaculado se pueden producir la mitad de dosis inseminantes.

- La producción de las dosis es más costosa en tiempo y materiales, requiere de equipamiento sofisticado y oneroso.
- El mantenimiento de las dosis en tanques de nitrógeno líquido es costoso.
- Requiere una adaptación de los productores a una nueva técnica y capacitación del personal para el manejo de semen congelado.

Refrigeración de semen porcino

El semen porcino se conserva diluido y a una temperatura de 15 a 18°C, a esa temperatura, el espermatozoide de cerdo se encuentra en “anabiosis” (sin vida aparente): no hay metabolismo espermático, aunque los espermatozoides preservan su capacidad fecundante.

El semen de cerdo diluido en medios isotónicos apropiados para la conservación a 15-18°C, se mantiene por un máximo de 8 a 10 días, y esto constituye una limitante para su uso.

Para prolongar indefinidamente el tiempo de conservación, existe otro método de conservación, que consiste en congelar las células espermáticas.

Congelación de semen porcino

El proceso de la congelación para el semen de verraco comprende las siguientes etapas:

- a. Dilución: la adición de un medio que reemplaza el plasma seminal es necesaria para mantener la integridad de la célula espermática.
- b. Equilibración: período de dos a cinco horas durante el cual se establece un intercambio proteico entre el plasma seminal y la célula espermática, que le permite a ésta aumentar su resistencia a la congelación.
- c. Centrifugación: el gran volumen eyaculado por el verraco hace que para la congelación sea necesario la eliminación total o parcial del plasma seminal, metodología que facilita la congelación y descongelación del mismo. La concentración del material espermático disminuye los daños producidos en la célula durante el enfriamiento, al ser ésta menos susceptible que al encontrarse diluida en plasma seminal. Por lo tanto, la remoción del mismo es ventajosa, pero su eliminación total no es esencial para la supervivencia del espermatozoide (Foto 1)
- d. Enfriamiento: consiste en descender la temperatura hasta alcanzar los 5°C, en un tiempo relativamente largo. En esta etapa se añade un protector de membrana, el biológico más utilizado, en esta especie, es la yema de huevo. Luego de haber alcanzado los 5°C, se hace una segunda dilución, con el agregado de un crioprotector que generalmente es el glicerol.

e. Preparación de las dosis: la forma de presentación más usual es la de pajuelas (maxi y mini pajuelas).

f. Congelación: consiste en someter al material espermático a temperaturas por debajo de 0°C, las pajuelas se congelan a -120°C, en vapores de nitrógeno líquido.

g. Conservación: debe realizarse en contenedores con nitrógeno líquido a una temperatura de -196°C.

Descongelación: el volumen de semen congelado es pequeño y variable según el método elegido para su acondicionamiento, pero el volumen necesario para una dosis inseminante debe ser de 100 a 200 ml por lo que se hace necesario agregar un diluyente que cumpla la doble función de dar volumen y descongelar simultáneamente.

El semen congelado en maxi-pajuelas para su descongelación es sometido a un baño térmico cuya temperatura oscila entre 35 a 40°C y una duración del proceso de 37 a 60 segundos. Luego, se procede a cortar la pajuela y volcar sobre 50 ml de diluyente de descongelación a 35°C.

Aplicaciones y desarrollo

Variaciones individuales en el perfil de ácidos grasos de espermatozoides porcinos

En los organismos aeróbicos el oxígeno es esencial para la vida, pero puede ser tóxico cuando se presentan situaciones desfavorables en las cuales hay una producción exagerada de especies reactivas del oxígeno (Hicks, 2001). Las membranas de los espermatozoides son ricas en ácidos grasos polinosaturados y son sensibles al daño oxidativo mediado por el proceso de peroxidación lipídica (Sheweita et al, 2005). La peroxidación lipídica es causa potencial de infertilidad en machos de numerosas especies. Los niveles en los cuales los espermatozoides pierden movilidad in vitro se correlacionan con la tasa de peroxidación lipídica que sufren. Los espermatozoides porcinos son muy sensibles al proceso de congelación-descongelación (Watson, 1995), por lo cual es importante determinar el perfil de ácidos grasos y la susceptibilidad a la peroxidación lipídica en muestras de semen porcino al estado fresco (Marmunti et al, 2009)

Las variaciones individuales en el perfil de ácidos grasos observadas en las muestras analizadas podrían influir en la supervivencia del semen porcino de diferentes individuos al proceso de congelación-descongelación. Se considera que la composición química de la membrana plasmática del espermatozoide es responsable de la susceptibilidad al congelado entre especies (Parks y Lynch, 1992) Sin embargo diferencias intra especies podrían contribuir a la variabilidad individual (Medrano y Holt, 1998)

El semen porcino contiene grandes cantidades de ácidos grasos no saturados, los cuales son vulnerables a la peroxidación lipídica. La alteración en la composición de los mismos sería la base común de diferentes procesos degenerativos (Gavaza y col., 2010; Marmunti y col., 2012).

Efecto antioxidante de *lycospersicum esculentum* en ensayos con semen porcino

Los antioxidantes son sustancias que cuando se encuentran presentes en bajas concentraciones respecto a los sustratos oxidables, retrasan o anulan la oxidación de dicho sustrato (Faudale et al., 2008) Existen evidencias de que los carotenoides podrían actuar como antioxidantes para la prevención de muchas enfermedades. El licopeno se halla casi exclusivamente en el tomate y sus productos. Se trabajó con muestras de semen porcino durante las diferentes etapas del proceso de criopreservación: 1) a 15°C, 2) 15°C + medio Boarciphos A (previo al enfriamiento), 3) a 5°C + medio Boarciphos A y 4) a 5°C + medio Boarciphos A + B (Prenna et al, 2012a)

Los valores de emisión lumínica de las diferentes etapas del proceso de criopreservación fueron estadísticamente significativos cuando se compararon las muestras controles con las que contenían ascorbato. Comparando los valores de la emisión lumínica de las muestras con ascorbato, se observó que en presencia del antioxidante los valores fueron más bajos. Durante el proceso de peroxidación lipídica, se observó que el porcentaje de ácidos grasos (AG) no saturados de las muestras tratadas con ascorbato (31,3%) disminuyó significativamente con respecto a los controles (53,73%). El porcentaje de AG no saturados de las muestras con el antioxidante fue de aproximadamente 62,03% siendo este valor similar al de las muestras controles (Prenna et al, 2012a)

Los antioxidantes previenen la lipoperoxidación utilizando diferentes mecanismos. El licopeno posee una elevada capacidad in vitro para ligarse al oxígeno singlete. Nuestros resultados indican que la lipoperoxidación podría ser uno de los mecanismos bioquímicos responsables de los cambios fisiológicos durante la criopreservación.

Criopreservación de semen porcino utilizando distintas concentraciones de glicerol y dodecil sulfato de sodio

Durante el proceso de congelación, con el descenso de la temperatura, hay una inevitable reducción de la proporción de espermatozoides que mantiene la normal integridad de

membrana, su ultraestructura y la composición bioquímica, siendo el espermatozoide del cerdo el de mayor susceptibilidad respecto a otras especies. Para disminuir estas alteraciones, se utiliza el glicerol como crioprotector más un agente surfactante como el dodecil sulfato de sodio (SDS: por sus siglas en inglés) con un efecto beneficioso al producir la solubilización de las membranas y sus componentes (Peña y col., 1998).

En un estudio realizado utilizando distintas concentraciones de glicerol y de SDS, se evaluó el impacto en la calidad espermática durante el proceso de congelación-descongelación (Miglio y col, 2012) Comparando los distintos valores de calidad evaluados, con los medios con glicerol al 4% se obtienen valores aceptables en todos los parámetros estudiados, resultados similares a los obtenidos por Corcuera y col. (2007), quienes compararon distintas concentraciones de glicerol en el medio de congelación. Con respecto a la concentración de SDS, los mejores resultados se obtuvieron con la menor concentración, resultando la mejor combinación la de 4% de glicerol y 0,5% de SDS (Miglio y col., 2012), coincidente con la utilizada por Córdoba-Izquierdo y col (2005).

Daño ultraestructural en la membrana de espermatozoides porcinos durante el proceso de congelación-descongelación

Las alteraciones del espermatozoide porcino durante el proceso de congelación-descongelación pueden ser diagnosticadas mediante el microscopio óptico, pudiéndose complementar con la microscopía electrónica para evaluar el daño ultraestructural que sufre la célula espermática durante el proceso de congelación. En un trabajo realizado con muestras de semen pos-enfriamiento (5°C, Foto 2) y al momento de la descongelación (Foto 3), analizadas por Microscopía Electrónica de Transferencia (MET), se observó el grado de deformación de la membrana citoplasmática, y el efecto deletéreo del proceso de congelación (Prenna et al, 2012b)

Bibliografía

- Corcuera y col, 2007. Effect of lactose and glycerol on the motility, normal apical ridge, chromatin Theriogenology 67: 1150-1157.
- Córdoba-Izquierdo y col, 2005. Effect of different temperatures on the viability, in vitro fertilizing capacity and chromatin condensation of frozen boar Anim. Reprod Sci., 92: 145-154.
- Courtens, J.L.; Paquignon, M. 1985. Ultrastructure of fresh, frozen and frozen-thawed spermatozoa of the boar. Proceedings of 1st International Conference on Deep Freezing Boar Semen. Uppsala, Sweden, 25-27, August- Swedish University of Agriculture Science, 61-67.
- Echegaray, A. 2001. ¿Para cuándo el semen porcino congelado? Venezuela Porcina., Año 17, N°48:3-5
- Faudale M y col. 2008. Antioxidant activity and phenolic composition of wild, edible, and medicinal fennel from different Mediterranean countries. J Agric Food Chem, 26;56 (6):1912-20.
- Gavazza, M; Marmunti, M; Williams, S; Gutierrez, Am; Piergiacomí, V; Palacios, A. 2010. Análisis de la peroxidación de ácidos grasos durante la criopreservación de semen porcino. Revista InVet (Investigación Veterinaria), 12 (2): 265
- Gavazza, M Marmunti, M, Williams, S, Gutiérrez, A.M, Piergiacomí, V., Palacios, A. 2010. Composición de ácidos grasos y daño peroxidativo de espermatozoides obtenidos de suinos de diferentes establecimientos Xº Congreso de la Asociación Latinoamericana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, Xº Congreso Nacional de Producción Porcina y XVIº Jornadas de Actualización porcina., Mendoza, del 8 al 11 de agosto: S48.
- Hicks JJ. 2001. Bioquímica. Mc Graw-Hill. México. 900 pp.
- Marmunti, M., Gavazza, M., Williams, S., Gutierrez, AM., Piergiacomí, V., Palacios, A. 2009. Variaciones individuales en el perfil de ácidos grasos de espermatozoides porcinos. 14º Congreso Brasileiro de Veterinarios Especialistas em Suínos (ABRAVES), Uberlandia (Mina Gerais), Brasil: 239-240
- Marmunti, M., Gutiérrez, AM; Gavazza, M; Williams, S; Palacios, A. 2012. Susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of fresh boar semen obtained from different hog farms. Rev. Vet, 23, 1: 8-14
- Maxwell W.M.C.; Johnson, L.A. 1997. Membrane Status of Boar After Cooling or Cryopreservation. Theriogenology, 48:209-219
- Medrano A, Holt WV. 1998. Inter-individual boar sperm susceptibility to freezing-thawing protocols. Archivos de Zootecnia 47: 319-327.
- Miglio, A; Prenna, G; Fernández, V; de la Sota, RL; Williams, S. 2012. Criopreservación de semen porcino utilizando distintas concentraciones de glicerol y dodecil sulfato de sodio. XI

- Congreso Nacional de Producción Porcina y VI Congreso de Producción Porcina del Mercosur, Salta del 14 al 17 de agosto, R2: 230
- Parks JE, Lynch DV. 1992. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology* 29: 255-266.
- Peña y col., 1998. Effects of sodium dodecyl sulphate on post-thaw dog semen quality during in vitro incubation at 39°C and 22°C. *Reprod. Dom. Anim.*, 33:393-398.
- Prenna, G; Gavazza, M; Marmunti, M; Williams, S; Gutierrez, Ma; Piergiacomini, V; Palacios, A. 2012a. Efecto antioxidante de lycopersicum esculentum en ensayos con semen porcino. XI Congreso Nacional de Producción Porcina y VI Congreso de Producción Porcina del Mercosur, Salta del 14 al 17 de agosto, R3: 231.
- Prenna, G; Miglio, A; Peralta, R; Jurado, S; Williams, S. 2012b. Daño ultraestructural en la membrana de espermatozoides porcinos durante el proceso de congelación-descongelación. Terceras Jornadas Internacionales del Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal – INITRA. Buenos Aires, del 15 y 16 de noviembre de 2012 (CD)
- Sheweita SA, Tilmisany AM, Al-Sawaf H. 2005. Mechanism of male infertility: role of antioxidants. *Curr Drug Metab.* 6: 495-501.
- Watson PF. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of the post-thawing function. *Reprod. Feril. Dev.* 7: 871-891.
- Watson, P.F. 2000. The Causes Of Reduced Fertility Of Cryopreserved Semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 60-61: 481-492
- Westendorf, P; Ritcher, L.; Tren, H. 1975. Zur tiefgefrierung von ebesperma: labor und besamungsergebnissmint dem Hülseberger pailleten verfahren. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.*, 82, 261-267.
- Williams, S, Fernández, V, Gabilondo, D, Valette, E, De La Sota, RL. 2009a. Study of different methods to evaluate acrosome integrity in diluted boar semen. VIII International Conference On Pig Reproduction (ICPR) Realizado en Banff (Alberta), Canadá, 31 de mayo al 3 de junio: 137
- Williams, S., Fernandez, V., Iglesias, L., Barrales, H., Proclemer, E., de la Sota, RL. 2009b. Medición de parámetros de calidad seminal según etapas durante el proceso de criopreservación. 14º Congreso Brasileiro de Veterinarios Especialistas em Suínos (ABRAVES), realizado en Uberlandia (Mina Gerais), Brasil: 623-624
- Williams, S, Fernandez, V; Iglesias, L; Barrales, H; Proclemer, E; De La Sota, RL. 2010a. Variaciones en la calidad del semen porcino durante el proceso de congelación-descongelación Xº Congreso de la Asociación Latinoamericana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, Xº Congreso Nacional de Producción Porcina y XVIº Jornadas de Actualización porcina., Mendoza, del 8 al 11 de agosto: S47.
- Williams, S; Fernández, V; Prenna, G; Barrales, H; De La Sota, RL. 2010b. Efecto de la criopreservación sobre la calidad de semen porcino y diferencias según individuos. *Revista InVet (Investigación Veterinaria)*, 12 (2): 299



Foto 1. Centrifugación de semen durante el proceso de congelación.



Foto 2. Imagen por MET de cabezas de espermatozoides porcinos luego del enfriamiento (5°C) sin alteración de la membrana plasmática

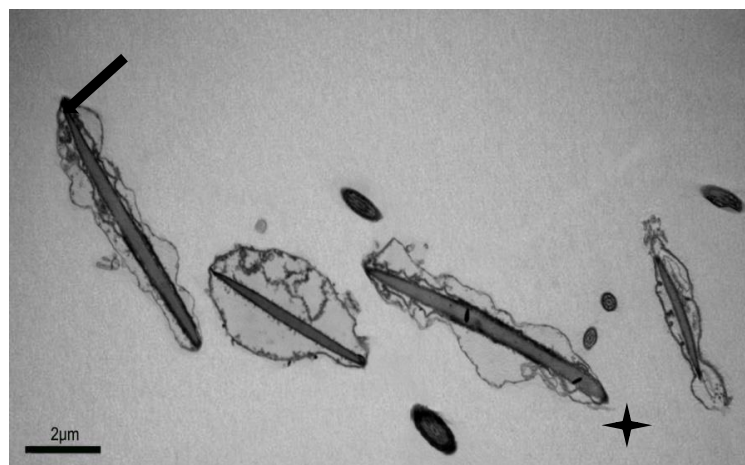


Foto 3. Imagen por MET de cabezas de espermatozoides porcinos luego del proceso de congelación-descongelación. Se observan distintos grados de hinchazón de las membranas plasmática y acrosomal, ruptura de membrana (cruz) y contenido acrosomal heterogéneo (flecha).

CAPÍTULO 39

Inseminación artificial en la especie porcina

*Sara Williams, Valeria Fernández, Maricel Compagnoni,
Hernán Barrales*

Metodología

Signos externos y comportamiento sexual

La hembra de la especie porcina es poliéstrica continua (ciclos sexuales ininterrumpidos durante todo el año) y su ciclo estral dura aproximadamente 21 días, ocurriendo durante el estro modificaciones anatomofisiológicas visibles externamente.

La duración del estro puede ser de 36 a 90 hs, con un promedio de 53 hs, ocurriendo la ovulación entre las 36 a 40 hs luego de la aparición de los signos externos y su duración aproximada es de 3 hs.

Con el aumento en los niveles de estrógenos, comienzan las manifestaciones de celo, que se caracterizan, externamente, por un edema e hiperemia vulvar. Además, cambia la conducta de las cerdas, ya que se las ve más ariscas, realizan una serie de gruñidos característicos, y montan a otras cerdas o bien, se dejan montar.

En presencia del macho la cerda presenta el test de "inmovilidad" ya que se mantiene quieta y se deja montar por el verraco. En el 80% de las hembras adultas, el reflejo de inmovilidad puede ser comprobado por un operador, quien debe ejercer una presión sobre el lomo de la cerda. La detección correcta del celo de la hembra es imprescindible para determinar el

momento exacto a realizar la inseminación artificial. Es por ello que es conveniente realizar como mínimo dos observaciones diarias, por la mañana y por la tarde, para registrar el inicio de las manifestaciones del celo de las cerdas.

En las manifestaciones de celo, el verraco cumple un rol muy importante, ya que de él parten estímulos acústicos, olfativos y visuales.

Estímulos olfativos: dado por las feromonas que se liberan por la bolsa prepucial, las glándulas salivares submaxilares, las glándulas sudoríparas y las glándulas carpeanas.

Estímulos acústicos: el verraco emite un gruñido característico, denominado “canto de cortejo”.

Estímulos visuales: la presencia del macho y, fundamentalmente, el contacto con él, estimulan a la hembra.

Por todo lo expuesto anteriormente, puede deducirse la importancia de contar con un verraco recela (retajo) a la hora de detectar celo en las cerdas. Una correcta detección, debe conjugar la:

- Observación de los signos externos en la cerda (edema e hiperemia vulvar)
- Observación del comportamiento sexual (actitud inquieta, gruñidos característicos y monta a otras cerdas).
- “Test de inmovilidad”, fundamentalmente detectado por un verraco, dos veces por día, recomendándose distanciar el intervalo entre la primera y la segunda detección (Foto 1)

Es conveniente realizar la detección de celo dos veces al día, para concretar con mayor precisión el inicio del celo y, en consecuencia, la elección del momento de inseminación artificial; siendo recomendable distanciar lo más posible el intervalo entre la primera y la segunda detección de celo, pudiéndose realizar la primera, a primer hora de la mañana y la segunda a última hora de la tarde.

Técnicas

Momento de Inseminación con respecto a la ovulación

Los resultados de fertilidad y prolificidad varían notablemente en función de lo cerca o lejos que se realice la inseminación del momento de ovulación.

Hay que tener en cuenta las siguientes consideraciones:

1. En general, y para aproximadamente el 70% de las cerdas, la duración del estro es de 48-72 horas, iniciándose el reflejo de inmovilidad frente al verraco en cualquier momento entre 2 y 25 horas desde el primer signo externo del celo. Otro 15% de las cerdas presentan celos de menos de 40 horas y el otro 15% de más de 72 horas.

2. Las sucesivas investigaciones han demostrado que hay muy poca ovulación antes de las 24 horas primeras después de la aparición del reflejo de inmovilidad, produciéndose la máxima ovulación aproximadamente 36-44 horas después del inicio de la inmovilización. Se ha comprobado, además, que a las pocas horas de producirse la ovulación desaparece el reflejo de inmovilidad.

3. Los ovocitos tienen una vida limitada tras la ovulación, entre 10 y 20 horas, y deben entrar en contacto con los espermatozoides inmediatamente después de la misma o en las 8 horas siguientes, ya que un óvulo se considera envejecido a partir de las 8-10 horas.

4. Los espermatozoides necesitan estar entre 4 y 6 horas en el tracto reproductivo de la hembra antes de poder fecundar algún óvulo, período denominado capacitación espermática.

5. La vida del semen de verraco después de la cubrición es de alrededor de 24 horas, pudiendo ser fecundados los óvulos entre 6 y 24 horas después de la cubrición. Por lo tanto, el mejor momento para una inseminación simple sería entre 12 y 16 horas después de iniciado el primer reflejo de inmovilidad.

6. Si realizamos la inseminación antes de las 6 primeras horas desde que la cerda comenzó la inmovilización puede haber una disminución del tamaño de la camada, dado que esta cubrición podría no ser efectiva en el período de máxima ovulación.

7. En el otro extremo, realizar la cubrición demasiado tarde en el segundo día del reflejo de inmovilidad podría no solamente aumentar la dificultad en cubrir a una cerda que ha perdido la fase de estro, sino que también se puede haber perdido la viabilidad de los óvulos lanzados en estadios precedentes.

El período óptimo se inicia 12 horas antes de la ovulación, por lo que un inadecuado momento de cubrición puede dar como resultado un fracaso total en la concepción, es decir, una repetición cíclica, o bien parcial originando un menor número de nacidos.

Aplicaciones

Elección del momento según distintos manejos

Aquellas hembras que manifiesten celo ante el macho podrán ser inseminadas tanto en el momento de la aceptación del macho (1º I.A.) y repetir 24 hs después (2º I.A.) como a las 12 hs, como máximo, después de aceptar el verraco (1º I.A.) y efectuar la 2ª I.A. 12 hs después de la primera.

En la práctica, si realizamos una sola detección de celo por día, realizaremos la 1º I.A. durante esa mañana y la 2º I.A. a la mañana siguiente (TABLA 1):

TABLA 1. Momento de inseminación artificial, con una detección de celo por día.

	Día 1	Día 2	Día 3
Mañana	celo 1º I.A.	celo 2º I.A.	si hay celo 3º I.A.
Tarde	- -	- -	- -

Con dos detecciones de celo diarias, una cerda en celo por la mañana, recibe la 1º I.A. por la tarde de ese día y la 2º I.A. a la mañana siguiente (TABLA 2).

TABLA 2. Momento de inseminación artificial, con dos detecciones al día (caso 1).

	Día 1	Día 2	Día 3
Mañana	celo	celo 2º I.A.	si hay celo 3º I.A.
Tarde	celo 1º I.A.	- -	- -

Si presenta celo por la tarde, se inseminará a la mañana del día siguiente (1º I.A.) y la 2º I.A., 12 horas después (TABLA 4).

TABLA 3. Momento de inseminación artificial, con dos detecciones diarias (caso 2).

	Día 1	Día 2	Día 3
Mañana	- -	celo 1º I.A.	si hay celo 3º I.A.
Tarde	celo	celo 2º I.A.	- -

Aproximadamente el 80% de las cerdas presentan celo a los 3-5 días después del destete y más del 77% de las hembras ovulan entre los 5 a 7 días después del destete. En la práctica de la I.A., se recomienda lo siguiente:

Las cerdas que presentan celo más tempranamente después del destete (día 3º a 4º), muestran celo por más de tres días, por lo que la I.A. se debería comenzar a partir del 2º día de celo (TABLA 4).

TABLA 4. Momento de inseminación artificial, en cerdas que salen en celo entre el 3º a 4º día post-destete.

	Día 1	Día 2	Día 3
Mañana	celo	celo 1º I.A.	Si hay celo 3º I.A.
Tarde	celo	celo 2º I.A.	- -

Cerdas con un intervalo promedio destete-salida en celo de 5 días, presenta una duración de estro de aproximadamente 2 días, y las inseminaciones pueden realizarse 24 horas luego del inicio del celo y la segunda I.A. 12 hs después.

Aquellas hembras que presentan celo luego del día 6 post-destete, tienen un celo corto, de un día, por lo cual la inseminación debe realizarse dentro de las 24 horas de la detección de celo.

La media de las cerdas que manifiestan celo temprano (3º y 4º día post-destete), lo mantienen por más tiempo, llegando a poder realizar una nueva inseminación al tercer día, siempre y cuando, la cerda tenga claras manifestaciones de estro. Contrariamente, aquellas cerdas que retrasan su salida en celo hasta el 7º día o más, tienen celos más cortos, por lo cual hay que inseminar cuanto antes, sin espaciar mucho las dos primeras inseminaciones.

Aplicación de la dosis seminal: distintas técnicas.

Es necesario que la hembra permanezca inmóvil al momento de ser inseminada. Luego de haber higienizado los genitales externos femeninos, se introduce la sonda por la comisura inferior de la vulva dirigiéndola hacia el techo de la vagina para evitar introducir el catéter en el meato urinario.

Ubicado el catéter en la vagina y con el fin de franquear las protuberancias del cuello del útero, se efectúan con la sonda movimientos rotatorios e introductorios hacia la izquierda (en sentido contrario a las agujas del reloj). El paso siguiente es introducir el material seminal ya sea por acción de la gravedad o por presión manual ejercida sobre el recipiente que contiene el semen. Completada la inseminación, maniobra que dura de 2 a 4 minutos, debe dejarse la sonda alrededor de un minuto más, con el fin de evitar el reflujo del material inseminado. Cuando se retira el catéter, debe hacerse imprimiéndole movimientos giratorios hacia la derecha (en el sentido de las agujas del reloj).

Existen dos tipos de técnicas para la aplicación de la dosis seminal:

Técnica rápida

Introducción del catéter.

Aplicación de la dosis a 37 °C, durante 2 a 3 minutos.

Técnica lenta

Introducir el catéter y dejar durante 2 minutos.

Introducir 10 cc de diluyente a 42°C.

Introducción de la dosis seminal a 37°C.

Introducción de 25-30 cc de diluyente a 42°C.

En la técnica de I.A. “manos libres”, se utilizan mochilas que se colocan en el lomo de las cerdas y que ejercen presión al incorporarles un peso, que es de 6-8 Kg para las primerizas y de 14 Kg para las cerdas. La mochila sostiene a la botellita con la dosis seminal y ésta, conectada al catéter de inseminación, se vacía por gravedad. El sistema “manos libres” permite: 1) La absorción de la dosis seminal por la cerda, de acuerdo a sus propias contracciones uterinas; 2) Se evitan los reflujos de semen, provocados por la impaciencia de los operarios durante la I.A. y 3) Disminuye el tiempo necesario para la inseminación, sobretodo con un gran número de cerdas, mejorando los resultados de fertilidad y prolificidad.

Desarrollo

Inseminación artificial post-cervical

Las técnicas de inseminación artificial que permiten la reducción del número de espermatozoides por dosis, incluyen por un lado técnicas no-quirúrgicas con deposición de la dosis, ya sea en el cuerpo del útero (IA post-cervical, Levis y col., 2002; Watson y Behan, 2002) o en los cuernos uterinos (Martinez y col., 2001a; 2001b), y por otro las técnicas quirúrgicas colocando los espermatozoides aproximadamente a 5 cm de la unión útero tubárica (Krueger y col., 1999; Krueger, 2000; Krueger y Rath, 2000; Rath, 2002; Rath y col., 2000)

La técnica de IA post-cervical tiene varias ventajas, entre ellas: a) se reduce el volumen de reflujo seminal post-IA; b) se utilizan menos espermatozoides por dosis; c) se utiliza menos volumen por dosis; d) al utilizar dosis de menor volumen, la IA se realiza más rápidamente; e) el costo por dosis es menor, al poder elaborar más dosis seminales de un mismo eyaculado y f) permite utilizar verracos de mayor valor genético.

Las técnicas de IA profundas, debido a que se realizan con una reducción en el volumen y en el número de espermatozoides por dosis, responden fácilmente a nuevas metodologías que requieren: 1) la necesidad de aumentar la eficiencia de aquellos verracos genéticamente superiores y lograr de ellos la mayor cantidad posible de dosis inseminantes; 2) el interés de utilizar semen que ha pasado por el proceso de congelación-descongelación, con la consiguiente disminución de su capacidad fecundante y 3) la aplicación del sexado de semen por citometría de flujo, que diferencia espermatozoides X e Y, aunque durante el proceso se recuperan menos cantidad de espermatozoides y con menor vida media, comparado con semen no-procesado (no sexado)

Bibliografía

- Levis, D. G., S. Burroughs, and S. Williams. 2002. Use of intra-uterine insemination of pigs: Pros, cons and economics. *Proceedings American Association of Swine Veterinarians*. 2002: 39-62
- Krueger, C., Rath, D; Johnson, LA.1999. Low dose insemination in synchronized gilts. *Theriogenology*; 52:1363-1373.
- Krueger, C., y Rath, D. 2000. Intrauterine insemination in sows with reduced sperm number. *Reproduction, Fertility and Development*; 12: 113-117
- Rath, D. Low dose insemination in the sow – a review. *Reproduction in Domestic Animals*. 2002; 37:201-205.
- Rath, D., Krueger, C.; Johnson, LA. 2000. Low dose insemination technique in the pig. In: *Boar Semen Preservation IV* (Editors: L. A. Johnson and H. D. Guthrie) : 115-118. Allen Press, Inc., Lawrence, KS
- Watson, P. F., y Behan, J. 2002. Intrauterine insemination of sows with reduced sperm numbers: results from a commercially based field trial. *Theriogenology*. 57:1683-1693



Foto 1. Detección de celo previo a la inseminación, con el uso de un padrillo

PARTE III

Métodos complementarios de diagnóstico

*Sara Williams, Valeria Fernández, Maricel Compagnoni,
Hernán Barrales*

CAPÍTULO 40

Ultrasonografía reproductiva

*Sara Williams, Valeria Fernández, Maricel Compagnoni,
Hernán Barrales*

Aplicaciones de la ultrasonografía

Uso de la ultrasonografía en reproducción porcina

Ya desde mediados de la década de los '80, se demostró que la ultrasonografía en tiempo real (UTR) sirve para el diagnóstico de gestación en cerdas (Inaba y col., 1983; Jackson, 1986). Pero fue recién en estos últimos años, cuando aparecieron equipos con precios razonables, más duraderos y modelos específicamente diseñados para usar en los galpones de servicio/gestación.

Ultrasonido: modo A y modo B

El ultrasonido tipo A, detecta la diferencia de densidad acústica ante la presencia de líquidos o no en la cavidad abdominal. El diagnóstico de gestación es a través de la detección de líquido amniótico, aunque la presencia de orina en la vejiga o la acumulación de material

purulento en el útero pueden dar resultados "falsos positivos". Ambos métodos pueden utilizarse recién a partir de la 4^o semana post-servicio o inseminación artificial.

En contraste, el ultrasonido tipo B, ultrasonografía en tiempo real (UTR) o ecógrafo de pantalla es un método para el diagnóstico de gestación con un alto índice de sensibilidad y especificidad que permite obtener resultados ya a partir de los 21 ± 3 días post-servicio (Inaba y col., 1983; Botero y col., 1986; Kauffold y Ritcher, 1997; Kauffold y col., 1997; Kauffold y col., 1998; Waberski y Weitze, 1998; Waberski y col., 1998; Knox y Althouse, 1999) Este diagnóstico precoz de gestación, permite decidir inmediatamente sobre el destino de las hembras vacías (inducción a celo o descarte) y, así, reducir el número de días no-productivos por cerda y año

Aplicación de la ultrasonografía reproductiva en la hembra porcina

Zonas de exploración

Para poder obtener los mejores resultados durante el diagnóstico de gestación, no sólo se deben conocer las estructuras que componen al aparato genital, sino además sus áreas de proyección y relaciones. La porción del aparato genital que se explora está proyectada sobre la región del hipo y mesogastrio. Dentro de la primera, en las sub regiones inguinal y pre pubiana se localizan los cuernos con una gestación temprana; mientras que en el mesogastrio, en la sub región del flanco, se proyectan el útero con gestación avanzada (más de 7 semanas) y los ovarios.

Diagnóstico de gestación

1. *Útero no-grávido*. Ante la presencia de un útero no-grávido, las imágenes muestran secciones transversales de los cuernos uterinos, que podrían confundirse con asas intestinales.

2. *Útero gestante*. La presencia de vesículas embrionarias en los cuernos uterinos, es un indicativo de preñez en la cerda. Estas estructuras son difíciles de distinguir antes del día 20 post-servicio, cuando es muy frecuente dar un falso diagnóstico.

Sin embargo, hacia el fin de la tercer semana de gestación, las vesículas embrionarias tienen un diámetro de 10 a 20 mm, con lo cual es fácil identificar su imagen anecogénica, por la presencia de líquido amniótico, dentro de la cual se distingue una imagen ecogénica, que representa al embrión.

El diagnóstico de gestación transcutáneo puede ser realizado ya a partir del día 18-20 de gestación, con una eficiencia en los diagnósticos del 74.5% (Amstrong y col., 1997). La

principal dificultad en el diagnóstico de gestación tan precoz, es el pequeño tamaño de las vesículas embrionarias que limitan la sensibilidad del equipo y el transductor. Por lo tanto, el diagnóstico de gestación por la vía transabdominal se recomienda realizarlo a partir del día 21 de gestación, cuando la eficiencia de las determinaciones por UTR alcanza el 97% (Foto 1)

A medida que avanza la gestación, las imágenes indicativas de preñez son más inequívocas, debido al aumento en el tamaño de las vesículas embrionarias y de los embriones, alrededor del día 30 de gestación, el contorno del embrión se vuelve evidente (Kähn, 1994).

En las semanas siguientes, varios de los órganos internos en desarrollo pueden ser visualizados: a partir de la 6^o ó 7^o semana, ecográficamente se pueden distinguir los latidos cardíacos y el estómago, cuya cavidad se hace visible a partir de esa fecha, correspondiendo a un feto de aproximadamente 50 a 60 mm. La parrilla costal se puede visualizar en fetos de 75-80 mm y con una edad gestacional de 7 a 8 semanas. La órbita, el estómago y los latidos cardíacos se individualizan como imágenes hipoeoicas y las vértebras, costillas y huesos largos se observan hiperecoicas (Kähn, 1994).

Otras aplicaciones: dinámica folicular

En los últimos dos años, ha crecido mucho el interés sobre el potencial uso de la UTR para observar el crecimiento folicular y la determinación de la ovulación y el momento apropiado de inseminación artificial (I.A.). El desarrollo folicular puede ser fácilmente observado utilizando la vía transcutánea o transrectal. El desarrollo folicular, la duración de la ovulación y el intervalo entre el inicio del estro y la ovulación, ya han sido reportados (Kemp y col., 1996; Knox, 1998; Soede y col., 1992, 1995; Weitze y col., 1994). A diferencia de lo que ocurre en otras especies, el promedio del tamaño folicular y la predicción de la ovulación varían mucho en la cerda, como para poder desarrollar un programa de momento de I.A. en combinación con UTR. La UTR, puede ser utilizada, como método para determinar el inicio de la actividad ovárica en una cerda (Althouse, 2001).

Con la ecografía transabdominal, los ovarios se visualizan cranealmente a la vejiga.

Las estructuras ováricas se visualizan más fácilmente con la ecografía transrectal. En forma práctica, la identificación del ovario se utiliza para: 1) controlar el desarrollo folicular en el período peri-ovulatorio (Soede y col., 1997), y 2) fundamentalmente, para determinar la actividad o inactividad ovárica en casos individuales de baja performance reproductiva. Sin embargo, la capacidad de diagnóstico de la actividad cíclica o de patologías en el ovario, está relacionada con el tipo de ecógrafo empleado y la experiencia del profesional (Waberski y col., 1998).

En cerdas destetadas, los folículos se visualizan pequeños (menos de 3 mm). En el momento del estro, pueden encontrarse folículos de aproximadamente 6 mm (Knox y Althouse,

1999; Williams y col., 2002). Las estructuras ováricas se visualizan mejor utilizando la ecografía transrectal y sondas con una frecuencia de 5 ó 7.5 mHz. Los grandes folículos (de más de 7,5 mm) pueden observarse utilizando la ecografía transabdominal, pero con menor poder de resolución.

Los folículos ováricos se ven como estructuras anecoicas, de contorno redondeado y de un diámetro de 1 a 6 mm, pudiendo aumentar a 8-11 mm en períodos cercanos a la ovulación (Foto 2)

Los cuerpos lúteos son imágenes hipoecogénicas, diferenciados débilmente del resto del estroma ovárico. Los cuerpos lúteos suelen observarse a partir del sexto día después del inicio del celo (4° día después de la ovulación) y hasta el día 16 del ciclo, aquí como estructuras hiperecogénicas con un diámetro de 10 a 12 mm

Con la ecografía de pantalla se puede diagnosticar la presencia de quistes ováricos (Knox y Althouse, 1999). Estos se visualizan como estructuras hipo o anecoicas y con un diámetro de 12 a 50 mm (Fotos 3 y 4). La incidencia de quistes ováricos puede llegar a ser de 5 al 14% (Nalbandov, 1952; Wrathall, 1980) y su importancia está relacionada con el número y la frecuencia de dichos quistes. Un solo quiste ovárico no produciría desórdenes reproductivos, pero si su número es mayor o bien las cerdas presentan repeticiones causadas por la presencia frecuente de quistes ováricos, se aconseja la eliminación de estos animales con antecedentes de infertilidad.

Aplicación en el macho porcino

La evaluación de la potencial fertilidad de un verraco generalmente involucra su historial genético, el examen clínico, el examen de los genitales externos, la conformación corporal (con énfasis en el aparato locomotor) y la evaluación del semen. Los testículos pueden ser palpados para evaluar su tamaño, simetría y consistencia. En el toro y el carnero, la circunferencia escrotal puede medirse, y existe una correlación positiva entre el peso y el volumen testicular con la producción espermática y el porcentaje de células normales. Debido a la particular anatomía de los testículos del verraco y su localización, la circunferencia escrotal no puede ser medida, y esto ha constituido una limitante para la evaluación de las características del testículo (Clark y Knox, 2000).

A diferencia de que lo pasa en la hembra, las variaciones en el aparato genital masculino sufren pocas modificaciones. Sin embargo, luego de conocer la estructura normal, la ultrasonografía en tiempo real (UTR) por su característica de método no-invasivo, es útil para poder diagnosticar anomalías en el tejido reproductivo, que podrían suplir al examen clínico y a la palpación.

Ultrasonografía del escroto y testículo

El examen ultrasonográfico del escroto y testículo se logra mejor con el animal de pie. Puede administrarse algo de alimento, para reducir los movimientos del animal. Pueden usarse sondas sectoriales o lineales. Lo más común es usar sondas con una frecuencia de 5 Mhz, las de 3.5 Mhz no tienen tanto poder de resolución y sobretodo no convienen para visualizar alguna patología. También pueden usarse sondas de 7.5 Mhz, pero a veces pueden no ser útiles en animales adultos, con un tejido escrotal muy grueso. En el momento del examen, puede usarse gel como medio de acople, aunque no es necesario.

Durante el examen, es necesario inmovilizar al testículo. Cuando se examina el testículo izquierdo, la mano derecha del operador se utiliza para inmovilizar al testículo, y la mano izquierda se utiliza para manejar la sonda y realizar el escaneo. La ubicación de las manos es inversa cuando se examina al testículo derecho. El testículo del verraco tiene un prominente mediastino, que puede ser visualizado por UTR o por disección anatómica.

La sonda se localiza primeramente en un punto medio sobre la superficie lateral del escroto, para visualizar el testículo, produciendo una imagen bidimensional de una sección transversal del testículo. Esta imagen muestra al parénquima testicular con una homogénea ecogenicidad y la imagen hiperecogénica del mediastino testicular. El transductor debe moverse hacia arriba y hacia abajo, para asegurarse que la sonda se mantiene perpendicular al mediastino testicular.

Luego de identificar el parénquima testicular, la sonda se mueve hacia dorsal y ventral, para visualizar la cola y la cabeza del epidídimo, respectivamente. A diferencia del parénquima testicular, el epidídimo tiene una imagen con una ecogenicidad heterogénea, que tiene el aspecto de un “queso gruyere”.

Interpretación de las imágenes por UTR

En el verraco, son raras las patologías asociadas al escroto, testículo, epidídimo y estructuras peri-testiculares. Las anormalidades de estos tejidos, generalmente ya son observadas con el examen clínico del animal. Además, suelen ser unilaterales y ésto permitiría en el examen ecográfico, diferenciar entre lo patológico y lo normal.

La medición del diámetro testicular, se podría calcular durante el examen por UTR. Pueden existir pequeñas diferencias de diámetro entre ambos testículos, que se considerarían normales si están en el orden del centímetro. Si la diferencia fuera mayor, se podría estar frente a un caso de degeneración o atrofia. En el verraco, el diámetro testicular no se correlaciona con el área de los túbulos seminíferos o la producción espermática total, como en otras especies (Cartee y col., 1986)

Las imágenes de patologías a nivel del testículo, mostrarían un tejido heterogéneo. Pueden verse zonas de ecogenicidad en el parénquima testicular, como “manchas” hiperecoicas que podrían corresponder a extensiones del mediastino testicular o a calcificaciones, posibles de ver en animales adultos. La orquitis se visualiza como un cambio en la normal ecogenicidad del parénquima testicular.

Con respecto a las patologías a nivel del epidídimo, podrían encontrarse quistes, que se visualizan como estructuras hipoecoicas. Los granulomas epididimarios aparecen como zonas hiperecoicas. Un epidídimo no-funcional aparece de menor diámetro (pequeño diámetro con respecto a la talla del animal), y muchas veces con un aspecto homogéneo. La epididimitis se visualiza como una imagen hipoecoica, diferente a la imagen heterogénea pero hiperecoica del epidídimo normal.

A nivel del escroto, se pueden distinguir alteraciones, como la acumulación de líquido en la pared escrotal o en la cavidad vaginal. En este último caso, se visualizaría un aumento de la distancia entre la superficie interna del escroto y el testículo. Esto puede deberse a una peritonitis (imagen heterogénea con la presencia de trazas de fibrina ecoica), hidrocele (anecoico), hematocele (ecogenicidad variable) o una hernia inguinal (tejido ecoico disperso dentro de una masa hipo o anecoica, generalmente con artefactos de la imagen, debido al gas del intestino).

Bibliografía

- Armstrong, JD; Zering, KD; White, SL, et al. Use of real-time ultrasound for pregnancy diagnosis in swine. 1997. Proc. 28th Ann Mt gamer Asso. Swine preact, Quebec City, Canadá: 195-202
- Botero O, Martinat-Bottè F, Bariteau F. 1986. Use of ultrasound scanning in swine for detection of pregnancy and some pathological conditions. *Theriogenology*; 26 (3): 267-278.
- Cartee, RE.; Powe, RD.; Gray, BW; et al. 1986. Ultrasonographic evaluation of boar testicles. *AJVR*, 47: 2543-2548.
- Clark, SG; Knox, RV. 2000. Utilizing real-time ultrasound to optimize swine reproduction. *Embryo Transfer Newsletter*, vol. 18, N°4: 16-22.
- Corner, GW. 1921. The ovarian cycle of swine. *Science*. 53:420–21
- Dalin, AM. 1987. Ovarian follicular activity during the luteal phase in gilts. *J Vet Med*. 34:592–601
- Dalin, A.M.; Nanda, T.; Hultén, F.; Einarsson, S. 1995. Ovarian activity at naturally attained oestrus in the sow. An ultrasonographic and LH study. *Acta Vet Scand*. 36:377-82
- Evans, ACO. 2003. Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals. *Reprod Dom Anim*. 38:240-46
- Foxcroft, GR y Hunter, MG. 1985. Basic physiology of follicular maturation in the pig. *J Reprod Fertil Suppl.* 33:1–19
- Flowers WL, Amstrong JD, White SL, Woodard TO, Almond GW. 1999. Real-time ultrasonography and pregnancy diagnosis in swine. *Proceedings of the American Society of Animal Science*; Indianapolis, Indiana, USA: 1-9.
- Guthrie, HD y Cooper, BS. 1996. Follicular atresia, follicular fluid hormones, and circulating hormones during the midluteal phase of the estrous cycle in pigs. *Biol Reprod*. 55:543–47.
- Guthrie, HD; Grimes, RW; Cooper, BS; Hammond, JM. 1995. Follicular atresia in pigs: measurement and physiology. *J Anim Sci*. 73:2834–44
- Inaba T, Nakazima N, Matsui N, Imori T. 1983. Early pregnancy diagnosis in sows by ultrasonic linear electronic scanning. *Theriogenology*; 20 (1): 97-191
- Kauffold, J, Rautenberg, T; Gutjahr, S; Richter, A; Sobiraj, A. 2004a. Ultrasonographic characterization of the ovaries in non-pregnant first served sows and gilts. *Theriogenology*. 61:1407–17
- Kauffold, J; Rautenberg, T; Richter, A; Wahner, M; Sobiraj, A. 2004b. Ultrasonographic characterization of the ovaries and the uterus in prepubertal and pubertal gilts. *Theriogenology*. 61:1635–48
- Kauffold, J; Rautenberg, T; Hoffmann, G; Beynon, N; Schellenberg, I; Sobiraj, A. 2005. A field study into the appropriateness of transcutaneous ultrasonography in the diagnoses of uterine disorders in reproductively failed pigs. *Theriogenology*. 64:1546–58

- Kauffold J y Ritcher A. 1997. Two years of ultrasonography in swine gynaecology - experiences. *Reprod Dom Anim*; 32 (1-2), S 115 (Abstr.)
- Kauffold J, Richter A, Sobiraj A. 1997. Ergebnisse und Erfahrungen einer zweijährigen untersuchungstätigkeit im rahmen der sonographischen Trächtigkeit-Kontrolle Bein sauen zu unterschiedlichen graviditätstagen. *Tierärzte Prax.*; 25: 429-437.
- Kauffold J, Ritcher A, Sobiraj A. 1998. Ultrasonography in swine gynaecology - Applications and perspectives. *Proc of Intern Conf on Pig Production*; Beijing: 647-651.
- Kähn W. 1994. Ultrasonography in the pig. En: *Veterinary Reproductive ultrasonography*. Mosby-Wolfe Ed. London (United Kingdom), pp. 213-226
- Knight, JB.; Bazzar Fuller, W.; Thatcher, WW; Franke, DE; Wallace, HD. 1997. Conceptus development in intact and unilaterally hysterectomized-ovariectomized gilts: Interrelations among hormonal status, placental development, fetal fluids and fetal growth. *J. Anim. Sci.*; 44: 620-637
- Knox RV y Althouse GC. 1999. Visualizing the reproductive tract of the female pig using real-time ultrasonography. *Swine Health Prod.*; 7 (5): 207-215.
- Martinat-Botté, F; Renaud, R; Madec, F. 2005. Ultrasonografía y reproducción en cerdas: principios y aplicaciones prácticas. 1º Ed. Buenos Aires, Inter-Médica.
- Miller, G.; Breen, S.; Roth, S.; Knox, R. 2002. Real-time ultrasound labor and image characterization for positive pregnancy diagnosis. *Proceedings of the 33º Annual Meeting of the American Association of Swine Veterinarians (AASV)*, 2-5 de marzo, Kansas City (Mo, USA): 343-344
- Nalbandov AV. 1952. Anatomic and endocrine causes of sterility in female swine. *Fertil. Steril*; 3: 100-114.
- Perry, JS. 1981. The mammalian fetal membranes. *J. Reprod. Fert.*, 62: 321-335
- Soede NM, Hazeleger W, Broos J, Kemp B. 1997. Vaginal temperature is not related to the time of ovulation in sows. *Anim Reprod Sci*; 47: 245-252.
- Soede, NM y Kemp, B. 1993. In synchronized pigs the duration of ovulation is not affected by insemination and is not a determinant for early embryonic diversity. *Theriogenology*. 39:1043-53
- Soede, NM; Noordhuizen, JTPM; Kemp, B. 1992. The duration of ovulation in pigs, studied by transrectal ultrasonography, is not related to early embryonic diversity. *Theriogenology*. 4:653-66
- Waberski D, Kunzschmidt A, Wagnerrietschel H, Kerzel I, Weitze KF. 1998. Ultrasonography in swine gynecology - Possibilities and limits. *Prakt Tierarzt*; 79: 257-262
- Waberski Dy Wietze KF. 1998. Sonographic diagnosis of reproductive failures in the pig - New aspects. *Prakt Tierarzt*; 41-44.
- Weitze KF; Habeck O, Willmen T, Rath D. 1989. Detection of ovulation in the sow using transcutaneous sonography. *Zuchthygiene*. 24:40-42

- Williams, S.; Fernandez, V. y de la Sota, RL. 2010. Dinámica folicular y momento de ovulación en cerdas púberes y pluríparas posdestete Revista InVet (Investigación Veterinaria), 12 (1): 33-42
- Williams S, Piñeyro P, de la Sota RL. 2000. Estudio comparativo de dos métodos ultrasonográficos para el diagnóstico de gestación en cerdas. Memorias del Congreso Mercosur de Producción Porcina; 22-25 de octubre Buenos Aires, Argentina, 2000, R3
- Williams, S; Piñeyro, P; de la Sota, RL. 2001. Ultrasonografía reproductiva en producción porcina. Analecta Veterinaria (CD-Rom); 21, 2: 50-56
- Williams, S; Piñeyro P, de la Sota RL. 2008. Accuracy and economics of pregnancy diagnosis in swine by ultrasonography. Can. Vet. J.; 49: 269-273
- Williams, S.; Fernandez, V.; de la Sota, RL. 2010. Dinámica folicular y momento de ovulación en cerdas púberes y pluríparas posdestete Revista InVet (Investigación Veterinaria), 12 (1): 33-42.
- Wrathall AE. 1980. Ovarian disorders in the sow. The Veterinary Bulletin; 50: 253-272.



Foto 1. Imagen transabdominal de una gestación temprana (21 días) en cerda

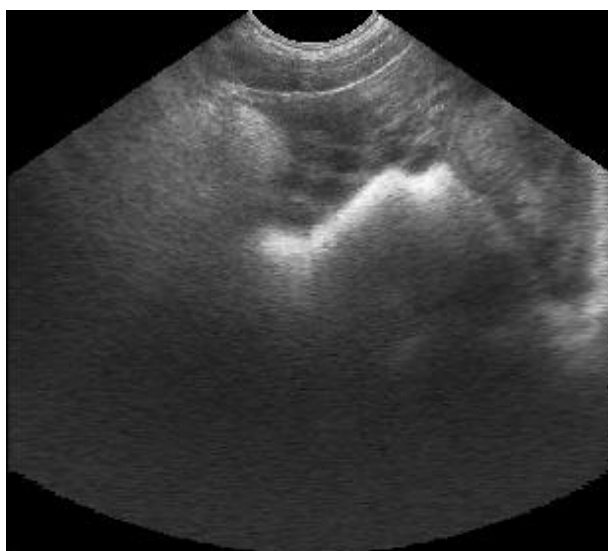


Foto 2. Ovarios con folículos pre-ovulatorios (Imagen transabdominal)

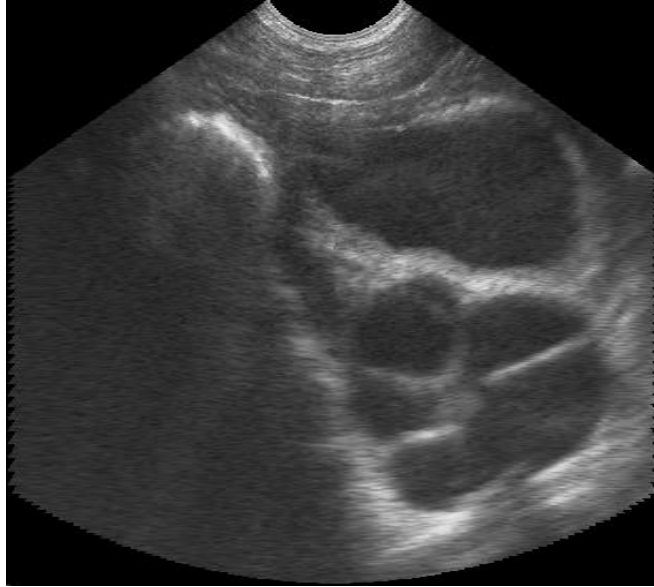


Foto 3. Ovario poli-quístico (Imagen transabdominal)

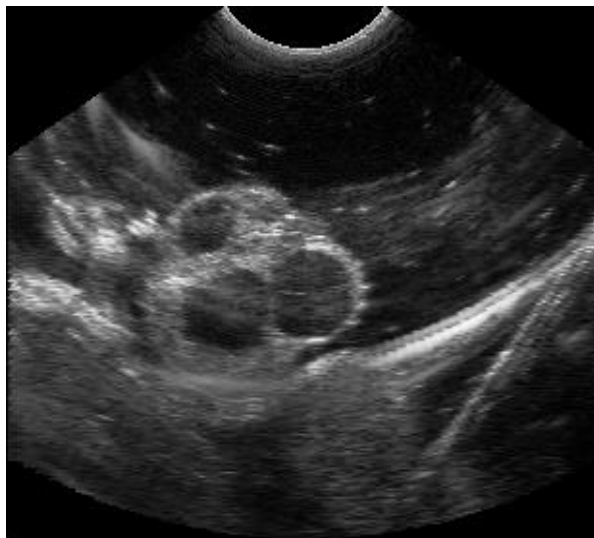


Foto 4. Quistes ováricos. Imagen obtenida con la técnica del “balde”

PARTE IV

Patologías reproductivas

*Hernán Barrales, Valeria Fernández, Maricel
Compagnoni, Sara Williams*

CAPÍTULO 41

Patologías reproductivas de la hembra porcina

*Hernán Barrales, Valeria Fernández, Maricel Compagnoni,
Sara Williams*

Principales lesiones y su prevalencia

En numerosos estudios realizados a partir de muestras obtenidas en frigorífico se describe que entre el 15 y el 49 % de las hembras descartadas presentan alguna alteración a nivel del aparato genital (AG). Las lesiones a nivel de las diferentes partes del AG varían de un estudio a otro, donde se destacan la presencia de ovarios inactivos (8-25 %), quistes ováricos (6-20 %) y alteraciones uterinas (1-22 %). A continuación se hace una breve revisión de estas alteraciones del AG.

Ovarios inactivos

Los ovarios inactivos son aquellos que presentan estructuras foliculares de un diámetro menor a 3 mm con ausencia de cuerpos lúteos y albicans. La inactividad ovárica está relacionada, en muchos casos, con una nutrición deficiente de la cerda nulípara previa a la pubertad o de la cerda primípara y plurípara durante la lactancia.

Quistes ováricos

Se considera quiste ovárico (QOv) a toda aquella estructura ovárica que supere el diámetro normal de un folículo o un cuerpo lúteo de apariencia quística. El diámetro a partir del cual se considera a una estructura quística es muy variable según los diferentes autores (Tabla 1).

Los QOv pueden ser foliculares o luteinizados. Los primeros se forman por una falla en la ovulación debido a una falta del pico de hormona luteinizante (LH) por lo que al no haber ovulación los folículos continúan aumentando de tamaño hasta enquistarse. Los QOv luteinizados se forman por un pico deficiente de LH, el cual no es suficiente para producir la ovulación pero si para provocar la luteinización de las células de la granulosa. El tamaño y la cantidad de quistes presentes en cada ovario son variables, pudiendo ser grandes o pequeños, múltiples o simples y uni o bilaterales.

Tabla 1. Diámetro a partir del cual se considera quiste a una estructura ovárica según diferentes autores

Autor	Diámetro
Martinat-Botté y col. (1998)	10 mm
Waberski y col. (1999)	11 mm
Vargas y col. (2009)	12 mm
Heinonen y col. (1998)	15 mm
Dobler Castagna y col. (2004)	20 mm

En estudios realizados mediante ultrasonografía de tipo B (USG-B), la incidencia de QOv varía entre el 2 y 30 % en el animal vivo. Mientras que se observaron valores entre un 5 a 10% en estudios realizados a partir de tractos reproductivos de hembras descartadas y evaluadas en frigorífico.

El efecto de los QOv sobre la fisiología reproductiva es diferente según el tipo de quiste presente. En general, los quistes simples y de gran tamaño sufren grados variables de luteinización y secretan progesterona (P_4), pudiendo producir una inhibición del eje hipotálamo-hipófisis-gónada que se expresa en falta de celo o anestro patológico. De modo contrario los quistes múltiples y de tamaño pequeño son secretores de estradiol (E_2) por lo que podrían producir aparición de celos a intervalos irregulares o ninfomanía.

En el estudio realizado por Vargas y col. (2009) se observó que cerdas nulíparas con QOv presentaron 7,6 veces más probabilidades de repetir celo en su primer servicio. Resultados similares a los presentados por Dobler Castagna y col (2004) para cerdas primíparas y pluríparas, donde el 50% de las cerdas con QOv presentó algún tipo de falla reproductiva.

Debe considerarse que en la cerda un quiste ovárico simple raramente afecta la fertilidad o el ciclo estral. Algunos autores afirman deben presentar al menos entre 5 y 10 quistes

luteinizados de gran tamaño (50 mm de diámetro) para que se produzca el anestro. Es así que para determinar si un QOv está afectando el desempeño reproductivo de una cerda es necesario relacionar varios factores, como ser: la signología clínica, los registros reproductivos, la cantidad y tamaño de los QOv y de las estructuras normales presentes en el ovario y las concentraciones séricas de hormonas sexuales.

Quistes paraováricos

Los quistes paraováricos son aquellos que se forman a partir de los túbulos mesonéfricos y conductos paramesonéfricos. En la especie porcina no presentan significancia clínica. Cuando tienen gran tamaño deben diferenciarse de los QOv durante la evaluación ultrasonográfica.

Endometritis

El diagnóstico de esta afección se basa en la evaluación clínica, el estudio anatomopatológico y la evaluación por USG-B. El principal signo clínico asociado a la endometritis es la descarga vulvar (DV) anormal. Dentro de las DV normales encontramos la observada al momento del celo, que es escasa, de tipo serosa, filante y trasparente. Las DV anormales pueden ser serosas, purulentas, hemorrágicas o combinaciones. Estas son el principal signo clínico de endometritis clínica.

La vía de infección generalmente es ascendente y los microorganismos aislados con mayor frecuencia son *Escherichia coli*, *Staphylococcus spp* y *Streptococcus spp* y en algunos casos *Actinomyces pyogenes*, *Enterococcus spp* y *Pasteurella multocida*. Provenientes en la mayoría de los casos del ambiente y la materia fecal. Se presentan con mayor frecuencia durante el postparto o en el periodo post inseminación artificial (IA). Esto se asocia a que el útero se encuentra bajo la influencia de la progesterona (P_4), que induce una inmunosupresión a nivel del endometrio.

Durante los primeros días postparto los niveles de P_4 se mantienen elevados, lo que permite la proliferación de los microorganismos presentes en el tracto genitourinario, lo que podría ser causa de endometritis. La higiene deficiente de las salas de maternidad aumenta el riesgo de presentación de endometritis y DV en este periodo.

La endometritis post IA está relacionada con la higiene de la vulva y de los elementos de inseminación como así también con el momento en que se realiza la misma. Las cerdas que son inseminadas hacia el final del estro tienen mayor riesgo de presentar endometritis, esto se relaciona con una disminución de las concentraciones plasmáticas de Estradiol (E_2) y a un

aumento de P_4 luego de la ovulación. Por esto una higiene deficiente y/o una inseminación tardía incrementan el riesgo de presentación de endometritis y DV.

A la necropsia para la evaluación anatomopatológica es necesario tener en cuenta que el aspecto macroscópico del endometrio varía según el predominio de las hormonas sexuales (P_4 y E_2), por esta razón se debe relacionar la etapa del ciclo estral en que se encuentra la cerda con los hallazgos, para evitar confundir procesos fisiológicos normales con inflamatorios. En los casos de endometritis clínica, se observa el endometrio de color rojo oscuro con marcado edema y congestión y en la mayoría de los casos una colecta de tipo purulenta. Las colectas en la luz uterina varían en cantidad y tipo, pudiendo hallarse desde pequeños flóculos de pus hasta colectas purulentas de gran volumen. Es de importancia destacar que en muchos casos pueden observarse colectas purulentas en la luz uterina sin que se registren lesiones a nivel endometrial.

Alteraciones de la glándula mamaria

Las alteraciones de la glándula mamaria (AGM) pueden dividirse en dos grupos: alteración de la producción láctea y procesos inflamatorios. Ambos se incluyen dentro del síndrome de agalaxia o hipogalaxia postparto. Los procesos inflamatorios, que incluyen cuadros de mastitis clínica y subclínica, son de etiología multifactorial y están influenciados por diversos factores predisponentes.

En cerdas con mastitis clínica se observa: temperatura rectal mayor a 40°C , anorexia, constipación, tumefacción, enrojecimiento y dolor a la palpación de las mamas, presencia de secreción purulenta a través de los pezones y en casos crónicos, endurecimiento de las mamas con pérdida del tejido glandular. En las camadas de cerdas con AGM se observa una disminución del aumento diario de peso y aumento de la mortalidad de lechones asociada a la inanición e infecciones sistémicas.

Aplicaciones

Ultrasonografía

La ultrasonografía es uno de los métodos más eficaces para la evaluación de las patologías del aparato reproductor en la granja. Los QOV son fáciles de identificar mediante USG-B, dentro de los diagnósticos diferenciales en las imágenes ecográficas se encuentran: la preñez temprana, los quistes paraováricos y los cuerpos hemorrágicos. Entre el 60 y 75% de los quistes son observables por USG-B durante 15 días desde el momento de su formación, es así

que el seguimiento de la dinámica de los QOv es una rutina útil para el diagnóstico de alteraciones ováricas, la aplicación de tratamientos hormonales o la decisión del descarte en caso de que el quiste persista.

La inactividad de los ovarios también puede ser diagnosticada por USG-B, para estos casos también es útil para la aplicación de tratamientos hormonales, porque permite determinar la fase del ciclo de la cerda y así elegir el mejor protocolo a aplicar.

La detección de procesos inflamatorios en el útero suelen ser difíciles de identificar por métodos ultrasonográficos dado que también la ecogenicidad de la pared varía a lo largo del ciclo. En los casos de endometritis detectables por USG-B se observa la luz del útero anecoica y, en algunos casos, puede observarse en su interior algunos puntos hiperecoicos que aparecen y desaparecen, estas últimas son imágenes compatibles con presencia de colecta purulenta en la luz del útero. Sin embargo en la práctica estas imágenes no siempre se interpretan de manera correcta, dado que se necesita entrenamiento y experiencia por parte del operador.

Evaluación del aparato genital (AG) en frigorífico

En la cerda el abordaje por vía rectal de los órganos genitales femeninos no es posible, es así que la inspección clínica particular del aparato reproductor se limita a la exploración de los genitales externos. Esta situación hace que sea difícil por un lado tomar una decisión de descarte correcta, fundamentada solamente en dicho examen y por otro lado en el caso de los DTR, conocer los factores que desencadenaron la falla reproductiva.

En este sentido la inspección del aparato genital en frigorífico brinda información complementaria para mejorar el criterio de descarte. Debido a que podemos evaluar la decisión de descarte a través de la presencia o no de lesiones. Si hay lesiones en el AG debemos relacionarlas con la historia clínica y los registros para determinar si dichas lesiones explican el descarte. La ausencia de lesión frente a un DTR indicaría una decisión incorrecta. A partir de este dato podremos realizar un análisis retrospectivo para determinar otras causas de dicho descarte como ser: problemas de manejo o gestión, nutrición, ambiente, entre otros.

Bibliografía

- D'Allaire S, Drolet R. In: Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire, Taylor DJ, editores. Diseases of Swine. 9 ed. Iowa: Blackwell Publishing; 2006. p. 1011-1025.
- de Winter PJJ, Verdoncka M, de Kruif A, Devriese LA, Haesebrouck F. Bacterial endometritis and vaginal discharge in the sow: prevalence of different bacterial species and experimental reproduction of the syndrome. 1995. *Anim Reprod Sci*; 37: 325-335.
- Dobler Castagna C, Peixoto CH, Bortolozzo FP, Wentz I, Borchardt Neto G, Ruschel F. Ovarian cysts and their consequences on the reproductive performance of swine herds. 2004, *Animal Reproduction Science*; 81: 115-123.
- Ebbert W, Elsaesser F, Bostedt H. Cystic Degeneration in Porcine Ovaries - Second Communication: Concentrations of Progesterone, Estradiol-17P, and Testosterone in Cystic Fluid and Plasma; Interpretation of the Results. 1993. *Reprod Dom Anim*; 28: 451-63.
- Engblom L, Selling LE, Lundeheim N, Belák K, Andersson K, Dalin A. Post mortem findings in sows and gilts euthanised or found dead in a large Swedish herd. 2008. *Acta Vet Scand*, 50:25.
- Grant Maxie M, editor. Jubb, Kennedy and Palmers's Pathology of Domestic Animals. 2007. 5th ed. Saunders ELSEVIER, p. 429-564.
- Heinonen M, Leppävuori A, Pyörälä S. Evaluation of reproductive failure of female pigs based on slaughterhouse material and herd record survey. 1998. *Anim Reprod Sci*; 52: 235-244.
- Kauffold J, Bussche B, Failing K, Wehrend A, Wendt M. Use of B-mode ultrasound and grey-scale analysis to study uterine echogenicity in the pig. *J 2010, Reprod Dev*; 56 (4): 444-448.
- Kauffold J, Rautenberg T, Gutjahr S, Richter A, Sobiraj A. Ultrasonographic characterization of the ovaries in non-pregnant first served sows and gilts. 2004. *Theriogenology*; 61: 1407–1417.
- Knauer M, Stalder KJ, Karriker L, Baas TJ, Johnson C, Serenius T, Layman L, McKean JD. A descriptive survey of lesions from cull sows harvested at two Midwestern U.S. facilities. 2007. *Prev Vet Med*; 82: 198-212.
- Martinat-Botté F, Renaud G, Terqui M, Madec F, Costiou P. Echographie et reproduction chez la truie. 1998. Paris, INRA editions; p. 77-87.
- Rodríguez M, Puche S, Vale O, Camacho JE. Hallazgos Patológicos del Tracto Reproductivo en Cerdas de Descarte en Venezuela. 2008. *Rev. Fac. Cs. Vets. UCV*; 49(1):9-15.
- Waberski D, Kunz-Schmidt A, Borchardt Neto G, Richter L, Weitze K. Real-time ultrasound diagnosis of ovulation and ovarian cysts in sows and its impact on artificial insemination efficiency. 1999. *Proceedings of the American Society of Animal Science, Indianapolis, Indiana, EEUU*: 1-8.

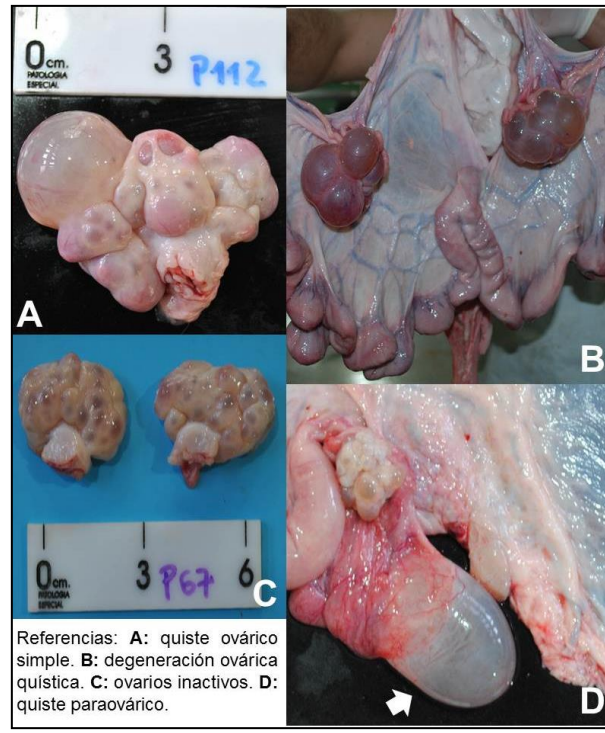


Foto 1. Lesiones ováricas más frecuentes.

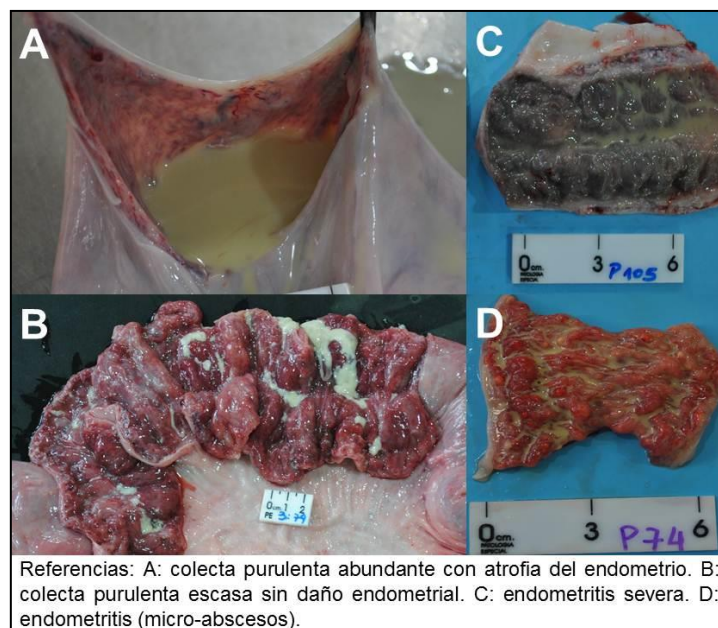


Foto 2. Diferentes presentaciones de endometritis.

CAPÍTULO 42

Patologías reproductivas del macho porcino

*Maricel Compagnoni, Hernán Barrales, Valeria Fernández,
Sara Williams*

Introducción

Las sospechas de una enfermedad reproductiva en el verraco, se generan cuando hay un cambio en los parámetros reproductivos de la granja, desde baja tasa de preñez, hasta abortos o repeticiones de celos, también surgen cuando los parámetros del Examen de Aptitud Reproductiva (EAR) no son los habituales para el macho en cuestión.

Por otro lado, es importante mencionar que en el cerdo, las patologías del aparato genital son las mismas que en otras especies, aunque pueden variar las causas. De todas formas las consecuencias son casi siempre las mismas, una mala calidad seminal y/o baja libido. A continuación haremos una revisión las patologías más comunes del verraco

Examen clínico

El primer paso para la detección de una afección reproductiva en el macho es el EAR. Mediante el mismo vamos a poder determinar si hay alguna alteración en los parámetros evaluados coincidentes con una enfermedad reproductiva. Durante el mismo deberemos realizar cuidadosamente un examen físico general, seguido de un examen físico particular del aparato reproductor y del aparato locomotor, ya que estos en conjunto, son claves para la realización del servicio. Por último, se deberá evaluar la calidad seminal, para descartar afecciones que puedan estar repercutiendo en la espermatogénesis.

Causas de mala calidad de semen

Estrés calórico

El estrés es uno de los factores que más comúnmente deriva en alteraciones de la calidad seminal. Existen variaciones individuales cuando se habla de la respuesta al estrés térmico. Dicha situación derivará en un aumento de las anormalidades espermáticas como gotas citoplasmáticas proximales, defectos en la pieza media, defectos de cola y cabezas anormales, así mismo se observará una motilidad y volumen reducidos. Generalmente los defectos mencionados aparecen 7 a 14 días después de la exposición a altas temperaturas y toma unas 5 a 8 semanas recuperar la calidad del semen. (Martínez Gamboa, 1989)

Frecuencia de monta

La frecuencia de eyaculación es uno de los puntos más relevantes que causan una disminución abrupta de la calidad seminal. Estudios demostraron que cuando un macho se colecta cada 24hs luego de un periodo de 5 días de reposo sexual, entre la primera y segunda colecta se cuenta con 46,9% menos de espermatozoides, mientras que en la sexta colecta ya la concentración bajo un 80.2%. Algo similar ocurre cuando se colectan varias veces en un mismo día, se registró que la concentración disminuye un 70% entre la primera y tercera colectas. Por otro lado, cuando un mismo macho monta de 2 a 6 veces por semana, siendo este último el límite máximo, y siempre que las montas no sean en días consecutivos, no existen diferencias notables entre el porcentaje de fertilidad ni en el tamaño de la camada. El

descanso prolongado también tiene consecuencias, ya que se ha demostrado que un periodo de más de 25 días de desuso, lleva a la presencia de espermatozoides “viejos” con baja capacidad fecundante (Martínez Gamboa, 1998)

Infecciones sistémicas que causen fiebre

Las afecciones de cualquier naturaleza que eleven la temperatura corporal del verraco, tienen los mismos efectos sobre la calidad seminal que las mencionadas para el estrés térmico. Disminuyéndola por aumento de morfoanomalías y baja motilidad.

Dentro de las bacterias que pueden causar infertilidad por hipertermia se encuentran: *Leptospira bratislava*., *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Salmonella choleraesuis* y *Pasteurella multocida* del serotipo B. Por otro lado, los virus que más se destacan son: Influenza, el Virus del Síndrome Respiratorio Reproductivo Porcino (VPRRS) y el Virus de Aujeszky

Afecciones del aparato reproductor

- Anomalías del desarrollo:

Las anomalías del desarrollo del sistema genital masculino pueden incluir: XXY (Síndrome de Klinefelter), XX regresión sexual, conducto de Müller persistente, translocaciones y la insensibilidad androgénica (feminización testicular). Estas anomalías se manifiestan clínicamente como ambigüedad en el fenotipo y/o infertilidad.

- Escoto

La estructura del escroto está adaptada a cumplir con su función, que es mantener la temperatura testicular por debajo de la corporal. Las alteraciones más comunes que sufre el verraco son: dermatitis causada por un ectoparásito, como la pulga *Tunga penetrans*, que excava túneles en la piel de la zona. Por otro lado, como en la mayoría de las especies, el escroto también está expuesto a sufrir miasis.

- Testículos y epidídimo

Los patógenos que se pueden localizar en el parénquima testicular e interrumpir la espermatogénesis incluyen: *Brucella*, *Chlamydophila*, *Virus de la encefalitis japonesa B* y *rubulavirus*. *Erysipelas*, micoplasmosis, influenza porcina, y otras enfermedades infecciosas que provocan una respuesta febril pueden interrumpir la espermatogénesis indirectamente. El virus de la fiebre aftosa, virus del cólera porcino, *Leptospira*, virus de la pseudorrabia (PRV), parvovirus porcino (PPV), circovirus porcino, enfermedad vesicular porcina y virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) puede ser eliminados a través del semen de

verracos infectados, permitiendo potencialmente que la enfermedad se propague en el hato de cerdas de cría.

El criptorquidismo es el descenso incompleto de los testículos y estructuras asociadas, y es una de las anomalías más comunes del sistema reproductor del macho. En el cerdo es una enfermedad con base hereditaria y rasgo recesivo, y en la raza Duroc Jersey hay tal vez involucrados genes recesivos de más de un locus. El anormal desarrollo del gubernaculum, incluido el subdesarrollo, crecimiento excesivo y ubicación anormal, son las causas más frecuentes de criptorquidia en cerdos.

La orquiepididimitis es causada por noxas infecciosas y no infecciosas, dentro de las primeras las de mayor relevancia son las causadas por bacterias.

Cuando hablamos de bacterias que causen orquiepididimitis, *Brucella suis* es el agente de mayor relevancia por su carácter enzoótico y por ser una zoonosis. Puede desarrollarse como una enfermedad clínica o no; de todas formas, en el macho los cambios degenerativos que se producen en la glándula tienden a ser más persistentes que en el útero de la cerda, pudiendo causar infertilidad y falta de libido. Otra cuestión a mencionar es que *Brucella suis* se acantona en las glándulas accesorias del tracto reproductivo del verraco, eliminándose grandes cantidades de bacterias a través del semen, contribuyendo a la rápida diseminación de la enfermedad.

Los traumatismos en el escroto pueden afectar tanto la integridad del parénquima testicular como del tegumento, de cualquier forma, todo proceso inflamatorio que se lleve a cabo en las cercanías de la gónada produce un aumento de la temperatura local, que lleva a cambios degenerativos en la hilera seminal que deriva en una baja calidad del semen.

- Pene y prepucio

Las patologías de estos órganos se consideran en conjunto. En el verraco la desviación peneana puede ser atribuida a la persistencia del frenillo peneano, a diferencia de otras especies como el equino que puede deberse a una asimetría del desarrollo de los cuerpos cavernosos, o como en el perro, que se desarrolla por la curvatura congénita del os penis.

Las afecciones del divertículo prepucial, tales como placas y úlceras se desarrollan en un 25-40% de los machos enteros o castrados. Las lesiones comienzan como focos de hiperqueratosis y progresan hacia placas blanco-grisáceas de 2-4 mm de diámetro. Tales lesiones pueden llegar a ser confluentes y hemorrágicas. La ulceración se observa con mayor frecuencia en cerdos adultos. En el divertículo también se pueden encontrar cálculos. La causa precisa de diverticulitis prepucial no es clara, pero la acumulación y descomposición de orina son consideradas de importancia primaria.

Bibliografía

Martínez Gamboa, RG (1989) "Principales factores que afectan la reproducción en el cerdo"
Departamento de Producción Animal: Cerdos Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Universidad Nacional Autónoma de México Ciudad Universitaria, 04510, México, D.F [en
línea] consultado el 19-02-2015 en:
<http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol8/CVv8c6.pdf>

PARTE V

Manejo reproductivo

*Hernán Barrales, Valeria Fernández, Maricel Compagnoni,
Sara Williams*

CAPÍTULO 43

Manejo reproductivo en reproducción porcina

*Hernán Barrales, Valeria Fernández, Maricel Compagnoni,
Sara Williams*

Manejo en bandas o flujograma

La planificación de un flujograma en una granja porcina es una herramienta útil para organizar las actividades del establecimiento. Se obtiene a través de unos sencillos cálculos matemáticos con los cuales se proyecta la población de una granja porcina por etapas o fases de crecimiento durante un determinado lapso de producción.

Mediante la puesta en práctica de estas medidas de manejo, el productor, puede organizar de manera más sencilla y eficiente las labores dentro de su establecimiento.

Entre las ventajas de realizar un diagrama de flujo en una granja porcina se encuentran: mejor aprovechamiento de las instalaciones, una oferta constante de producto al mercado y una mejora en las medidas sanitarias.

Es importante aclarar que la puesta en marcha de un flujograma es aplicable a cualquier tipo de producción, ya sea confinada o a campo. No es necesario contar con parámetros óptimos de producción para aplicar este tipo de manejo, sino que puede emplearse para alcanzar una mejora en los índices productivos de la explotación.

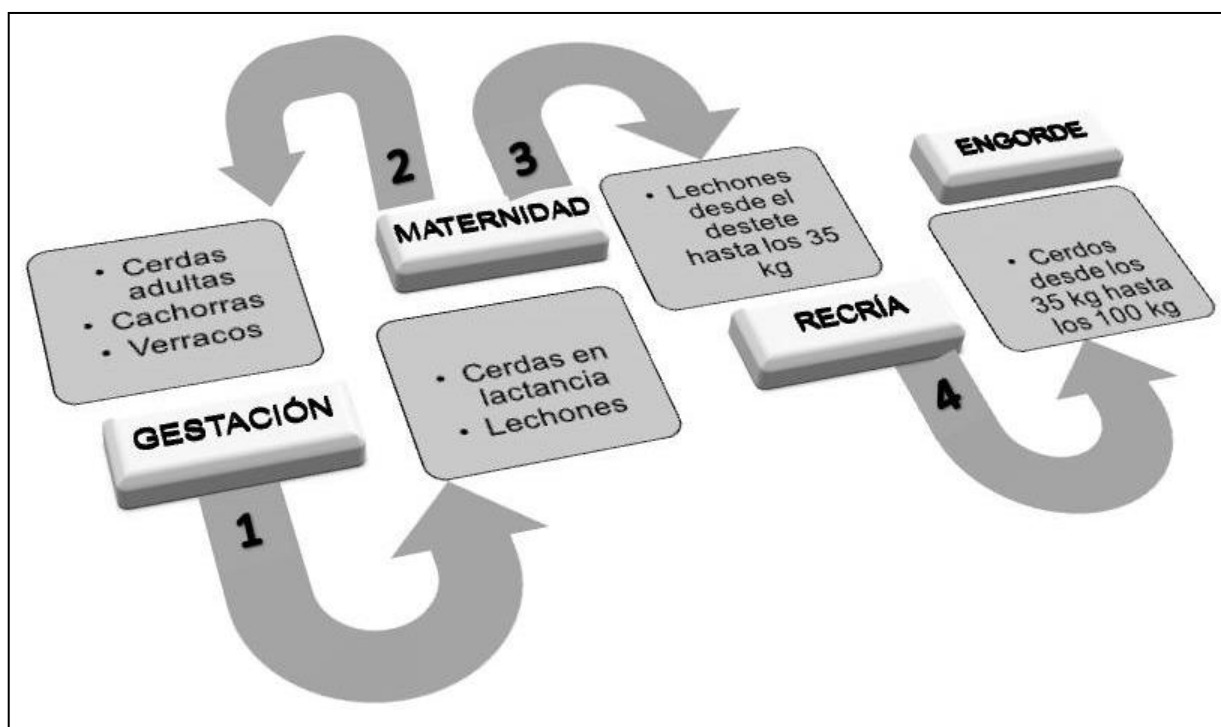
La producción dentro de una granja puede organizarse de dos maneras, producción continua o manejo en bandas:

- Manejo continuo: se realizan los servicios de las hembras de manera continua a medida que éstas van manifestando los celos. Este tipo de manejo no permite planificar las actividades (servicios, partos, destetes, etc.).
- Manejo en bandas o flujograma: consiste en programar las actividades (servicios, partos, destetes, ventas) a partir de la formación de grupos o bandas, de igual número de cerdas, las cuales son servidas en el mismo momento y a intervalos regulares de tiempo (semanal o cada tres semanas). Esto depende del número de madres del establecimiento justificándose un manejo semanal con un plantel superior a las 150 madres.

Diseño del flujograma

Para poder realizar el flujograma es necesario conocer tres elementos básicos de la producción. Las áreas en que se divide una granja, el movimiento de animales entre estas (Gráfico 1) y los índices de producción. Entre los últimos se destacan el porcentaje de preñez, la tasa de parto, la duración de la lactancia y el potencial de la línea genética utilizada (productividad numérica y velocidad de crecimiento en engorde).

Gráfico 1. Áreas de una granja y movimiento de animales dentro del establecimiento.



Referencias:

Las cerdas preñadas, una semana antes del parto son trasladadas a las instalaciones de maternidad.

.Las cerdas una vez destetados los lechones regresan a los galpones de gestación para volver a comenzar un nuevo ciclo productivo.

.Los lechones una vez destetados son trasladados a los galpones o cajones de recría.

.Una vez terminada la etapa de recría los animales ingresan al área de engorde (cebo o terminación) donde permanecerán hasta alcanzar el peso de faena.

Conceptos básicos para diseñar un flujograma

Para implementar un manejo en bandas es necesario dividir a nuestros animales en grupos estables y disponer de tiempos fijos de producción (días en los que se realizaran los servicios, partos y destetes como así también la duración de la lactancia). Estos eventos pueden planificarse según un ritmo de producción de una o tres semanas según las necesidades y el tamaño de la granja. A continuación se describen algunos términos necesarios para organizar el flujo de un establecimiento porcino.

1) Banda

- Es un grupo de animales que se encuentran en la misma etapa fisiológica y se desplazan juntos dentro del establecimiento según el ritmo de producción que se prefiera.
- La cantidad de bandas por establecimiento se obtiene dividiendo el ciclo reproductivo de la cerda por el ritmo de producción.

- El número de cerdas por banda es el resultado de dividir el total de hembras de la granja por el número de bandas.

2) Ciclo reproductivo de la cerda

Se refiere al tiempo transcurrido entre un parto y el siguiente. Está compuesto por tres periodos:

- Periodo de gestación: la gestación de la cerda dura entre 112 y 116 días, con un promedio de 114 días.
- Periodo de lactancia: Este periodo puede ser modificado por el productor, en líneas generales se utiliza un destete a tres semanas en los sistemas confinados y uno de cuatro semanas para los sistemas a campo.
- Intervalo destete – servicio: Es el tiempo transcurrido entre el día del destete y el día en que la cerda presenta celo y es nuevamente servida o inseminada. Buscando como objetivo de producción una duración de entre 4 y 7 días.

3) Tiempo de ocupación de parideras

Es el tiempo en el que una cerda ocupa una paridera más los días de vacío sanitario. Incluye:

- Días preparto: son los días que la cerda ocupa la paridera, antes del parto. La hembra ingresa a la sala de partos el día 110 de gestación con el fin de que se adapte a la instalación y se le pueda brindar la atención adecuada en el momento del parto.
- Duración de la lactancia: corresponde a los días transcurridos desde el momento del parto hasta el destete de los lechones.
- Vacío sanitario: es intervalo en días que se emplea para lavar, desinfectar y dar un tiempo de descanso a la paridera una vez retirados los animales. En los sistemas a campo además se incluye la rotación de las parideras, para disminuir la carga infectiva en los suelos. El tiempo ideal de vacío sanitario es de una semana completa, en la práctica se propone que los días de adaptación y descanso sumados duren una semana.

4) Tiempo de ocupación de las instalaciones de cría

Es el tiempo que el conjunto de lechones, destetados de una banda, ocupa una sala o cajón de cría más los días de vacío sanitario.

- Días de ocupación: son los días transcurridos desde el momento del ingreso de los animales a las instalaciones hasta el día en que alcanzan el peso de salida. Como objetivo de producción se busca lograr animales con un peso de salida de entre 30 y 35 kg en seis o siete semanas. Lo ideal es realizar un periodo de vacío sanitario

de una semana, en la práctica la limpieza, desinfección y descanso se realiza en tres a cuatro días.

5) Tiempo de ocupación de las instalaciones de engorde

Es el tiempo de ocupación de una pista de engorde desde la salida de la recría hasta la venta.

- Días de ocupación: son los días transcurridos desde el momento del ingreso de los animales a las instalaciones hasta el día en que alcanzan el peso de faena. Como objetivo de producción se busca lograr animales con un peso de salida de entre 100 y 110 kg en 12 a 13 semanas. Lo ideal es realizar un periodo de vacío sanitario de una semana, en la práctica la limpieza, desinfección y descanso se realiza en tres a cuatro días.

6) Sistema “Todo dentro - todo fuera” (“All in - all out”)

- Es un sistema de manejo en el cual se realiza el vaciado completo de las instalaciones (salas de maternidad, unidades de recría, pistas de engorde), para realizar la limpieza y el vacío sanitario de las mismas antes del ingreso de la nueva banda.

De esta manera se disminuye el contagio de enfermedades entre las bandas de animales que circulan dentro del establecimiento y disminuimos la carga de patógenos con la que se enfrentan el grupo al ingresar a la instalación.

Puntos críticos a tener en cuenta antes de implementar un flujograma

- Tomar registros de todos los eventos reproductivos (fecha de servicio, parto y destete entre otras).
- La sincronización de los celos.
- Detección de celos (capacitación de personal y manejo del macho).
- Mayor porcentaje de machos con respecto a un manejo continuo debido a que al tener las hembras sincronizadas estarán los servicios agrupados en una misma semana.
- Porcentaje de preñez para saber cuántas hembras servir por cuota de servicio.

Puntos críticos del control reproductivo

A continuación se hace una sinopsis de los factores a tener en cuenta al momento de evaluar y controlar el proceso reproductivo en una granja. Se dividió en los tres factores que influyen en el éxito reproductivo: la hembra, el macho y el ambiente.

Hembra

Hembras de reposición_(cachorra)

- Tasa de reposición: es importante contar con un *pool* de cachorras en el establecimiento, con el objetivo de implementar una reposición constante a lo largo del año.
- Selección: dicho pool debe permitir realizar una selección de las cachorras. Esta selección debe hacerse en base a potencial genético y conformación del aparato genital, mamario y locomotor.
- Edad y peso al primer servicio: es importante respetar este parámetro ya que si no se sirve a la cachorra en el momento oportuno se condiciona la vida útil de la misma. Cada línea genética presenta sus requisitos básicos, pero una edad de entre 210 a 240 días, un peso de 130 a 140 kg y con un servicio al menos en el tercer celo, se consideran parámetros guía en producción porcina.
- Rutina de detección de celo: debe realizarse dos veces al día, con la presencia del padrillo sin excepción. En caso de cachorras alojadas en corrales se debe ingresar al padrillo con el fin de que el estímulo sea el mismo para todas las cachorras.

Adulta

- Productividad numérica: deben evaluarse la cantidad de lechones nacidos totales y vivos en todos los partos para evaluar el desempeño a lo largo del tiempo.
- Días no productivos (ver mas adelante).
- Intervalo destete-celo: el mismo debe tener una duración de 3 a 5 días en la mayoría de las cerdas. Un aumento de este periodo puede estar relacionado con una nutrición deficiente en la lactancia.
- Condición corporal (CC): evaluar la CC en el segundo mes de gestación para poder realizar correcciones, lo ideal es que llegue al parto con una CC de 3 a 3,5. Si la cerda ingresa muy gorda puede traer problemas al parto. El segundo momento para

evaluar CC es al destete, deben salir con 2,5 a 3, si la cerda sale muy flaca no retornara al celo a las 3 a 7 días, aumentando así los días no productivos.

Padrillos

- Selección de los padrillos: evaluar los mismos parámetros que para las cachorras. Adquiriendo una gran importancia el aparato locomotor ya que al ser animales más pesados y que deben realizar la monta cualquier afección reduce considerablemente la vida útil del padrillo.
- Entrenamiento del padrillo de reposición: debe realizarse siempre por el mismo operario y de manera tranquila. La duración de cada sesión de entrenamiento no debe durar más de 30 minutos ya que si el macho fracasa las primeras veces y se le insiste por más tiempo puede asociar el entrenamiento con una situación estresante y no va a saltar en el futuro.
- Examen de la aptitud reproductiva.
- Evaluación biológica del semen.

Ambiente

- Clima: la temperatura óptima para los reproductores es de 18 a 22 grados centígrados. Si la temperatura es muy elevada puede traer problemas en la concepción en las hembras y de calidad espermática en los machos. Del mismo modo una temperatura elevada durante la lactancia puede afectar el consumo de alimento por parte de la cerda y influir negativamente en la producción de leche.
- Instalaciones: deben ser cómodas para el animal y de fácil utilización para los operarios de la granja. En caso de gestaciones colectivas y de padrilleras debe respetarse la superficie por animal (2 m^2 por cerda y para los padrillos de 6 a 8 m^2).
- Nutrición: deben cubrirse las necesidades de cada etapa reproductiva (desarrollo de cachorras, gestación, lactancia) con una formulación y administración adecuadas. La calidad y disponibilidad de agua son muy importantes, la misma debe ser fresca, palatable, de buena calidad y, en caso de bebedero chupete, con un caudal de por lo menos 2 litros por minuto.
- Sanidad: debe realizar un plan sanitario completo para las enfermedades reproductivas. Un plan sanitario básico consiste en vacunar a los futuros reproductores contra parvovirus, leptospira y erisipela a los 6 meses de edad con una segunda dosis a los 15 a 20 días. Luego de esta primo-vacunación se debe administrar una dosis 15 días preservicio. La segunda parte del plan consiste en el

monitoreo de la brucelosis, en cerdos no se utiliza vacuna para permitir la vigilancia serológica de esta enfermedad. Se realizan 2 a 3 sangrados al año.

Operarios de granja: el éxito reproductivo depende en gran medida de los operarios que realizan todas las actividades en la granja como ser: detección de celo, servicios, asistencia de los partos, alimentación de los animales, toma de registros entre otros. La capacitación constante y la motivación es una parte fundamental para lograr una buena calidad de recurso humano y eso depende exclusivamente del veterinario a cargo de la granja.

Evaluación de índices reproductivos: programas de análisis y control en reproducción porcina

Un programa de análisis y control de la reproducción es imprescindible dentro de la producción porcina dado que permite evaluar el desempeño reproductivo, detectar fallas y lograr una mayor eficiencia. Dicho programa puede responder a diversos objetivos, a enumerar:

- 1) Evaluar la eficiencia reproductiva
- 2) Detectar fallas reproductivas
- 3) Implementar medidas correctivas
- 4) Evaluar el impacto de las medidas aplicadas

El objetivo del análisis determinará a qué nivel se realizará el estudio, el periodo de tiempo a analizar y el método a emplear.

Niveles de estudio

Puede realizarse a tres niveles: establecimiento, grupos (clusters) e individuos. Dependiendo del enfoque aplicado podremos analizar el desempeño reproductivo de la granja, de un grupo de animales dentro de la misma o de un animal en particular. En la Tabla 1 se muestran algunos ejemplos de los parámetros que podrían evaluarse en cada uno de los niveles.

Tabla 1: niveles de evaluación de registros reproductivos

NIVEL	Parámetros
ESTABLECIMIENTO	Análisis de registros sobre el total de cerdas del establecimiento en un periodo determinado. Ejemplos: cantidad de partos/cerda/año, nacidos vivos/cerda/año, tasa de descarte anual, tasa de reposición anual, promedio de días improductivos/cerda/año.
GRUPO (CLUSTER)	Se realiza el mismo análisis que para el nivel anterior pero sobre un grupo específico del que nos interesa obtener información. Ejemplo: cerdas nulíparas, cerdas de menos de tres partos, cerdas de más de siete partos, cerdas abuelas o F1.
INDIVIDUOS	Se analizan los registros individuales de una reproductora para: evaluar su desempeño reproductivo, determinar la causa de una falla reproductiva o tomar la decisión de descarte.

Periodo de estudio

Evaluar periodos semanales y mensuales permite detectar y resolver problemas en el corto plazo. Evaluar periodos trimestrales o anuales permite evaluar la eficiencia global del establecimiento, el impacto estacional sobre la misma y determinar si se están alcanzando los objetivos reproductivos planteados.

Método: análisis dinámico y retrospectivo

El método de análisis aplicado nos permite monitorear diferentes etapas del ciclo reproductivo de la cerda. Puede aplicarse un análisis de las cerdas en producción (análisis dinámico) o de las cerdas que ya abandonaron el establecimiento (análisis retrospectivo). La aplicación en conjunto de estos métodos aportará mejor información para evaluar la eficiencia reproductiva, detectar problemas e implementar medidas correctivas.

Análisis detallado de registros

Dentro de la producción porcina el análisis de los registros tiene un papel fundamental para alcanzar una mayor eficiencia. El modo en que se analizan estos datos puede influenciar en los resultados obtenidos.

El promedio o media aritmética es una medida de tendencia central que permite evaluar de manera fácil y rápida el valor medio o promedio para un determinado parámetro dentro de una población. Es un dato de mucha utilidad pero que puede, en muchos casos, no representar lo

que está ocurriendo dentro de la granja. Esto se debe principalmente a dos factores: 1. Puede estar influenciado por valores extremos y 2. No muestra la dispersión de los datos.

Los valores extremos pueden “arrastrar” el promedio hacia valores extremadamente altos o bajos que pueden no representar la realidad del establecimiento a evaluar. Del mismo modo al no considerar la dispersión de datos en la población no podremos evaluar si los mismos son homogéneos.

Es por esta razón que cuando se analizan registros deben aplicarse tanto medidas de tendencia central (media, mediana y moda) como medidas de dispersión (varianza, desvío estándar y coeficiente de variación). El objetivo del presente trabajo no es realizar una revisión de estadística, por este motivo se muestra la importancia de este concepto en el siguiente ejemplo.

El análisis detallado de los registros permite: **1.** desglosar, ordenar y agrupar los datos, lo facilita la interpretación y presentación de los mismos; **2.** Realizar comparaciones entre diferentes establecimientos; **3.** Aplicar rigor estadístico al análisis; **4.** Implementar estudios de asociación, correlación y riesgo, entre otros.

Registros reproductivos en producción porcina

En la Tabla 2 se muestran los principales parámetros a evaluar y los objetivos mínimos a alcanzar. Luego se detallan algunos de los más importantes a la hora de evaluar la eficiencia de la granja.

Tabla 2 Objetivos reproductivos de una granja

Índice productivo	Sistema confinado	Sistema a campo
Días destete-servicio	5 a 7	5 a 7
Porcentaje de preñez	80 a 90	70 a 80
% Abortos	1 a 2	1 a 2
% Descarte de hembras	35 a 40	25 a 30
N° Nacidos vivos*	11 a 12,5	10 a 11
N° Lechones destetados	10 a 12	8 a 9
% Mortalidad en maternidad	7 a 10	8 a 12
Días de lactancia	21 días	28 días
Peso al destete (kg)	A los 21 días: 5,5 a 6	A los 28 días: 6 a 7
Camadas/hembra/año	2,2 a 2,4	2 a 2,2
Duración de la recría	6 a 7 semanas	7 a 8 semanas
Peso a la salida de la recría (kg)	30 a 35	30 a 35
Duración del engorde	12 a 13 semanas	12 a 14 semanas
Peso a la venta (kg)	100 a 110	100 a 110
% mortalidad destete-venta	2 a 4	4 a 6

*Depende de la línea genética utilizada.

Días no productivos

Se define como día no productivo o día improductivo (DNP) a aquel en que la cerda se encuentra vacía y no lactando. Dentro de su análisis deben considerarse los diferentes periodos que conforman el total de días no productivos de una cerda. Esto nos permite identificar en qué momento del ciclo reproductivo se produce el aumento de los DNP e implementar medidas correctivas, como así también, medir el impacto económico y productivo.

Los DNP afectan directamente la productividad numérica de la cerda y en definitiva de todo el establecimiento. Su importancia es tal que una disminución de 10 DNP resulta, en al menos, 0,5 lechones extra/cerda/año. Dado que afecta directamente el número de partos por cerda por año

Los DNP están divididos en los intervalos pre-servicio, de retorno y de remoción. Debemos considerar algunas particularidades de los diferentes intervalos para su correcta interpretación.

Intervalos pre-servicio:

- Intervalo ingreso-servicio: los DNP varían dependiendo de cuando se considera el ingreso de la cerda al plantel reproductor. Las dos opciones posibles son:
 - El ingreso coincide con el primer servicio. El objetivo para el promedio de DNP/cerda/año será de ≤ 40 .
 - El ingreso coincide con el primer celo. El objetivo de DNP/cerda/año será de ≤ 75 . En este caso se considera dentro de los DNP el periodo de adaptación de cada cerda (aproximadamente 60 días).
- Intervalo destete-servicio: Considerar estos días dentro del cálculo por más que su duración se encuentre dentro de los valores esperados (4 a 7 días).

Intervalos post-servicio:

- Retornos al celo y control de preñez negativo: contar los DNP desde el día del servicio hasta el día que se produce la falla reproductiva.
- Aborto: contar los DNP desde el servicio hasta que se produce la falla, incluyendo los días que la cerda se encontraba preñada.
- Vacía al parto y falla al parto: contar los DNP desde el servicio hasta la fecha del parto.

Intervalo de remoción:

- Descarte: contar los DNP desde el último evento exitoso registrado hasta el día que la cerda abandona el establecimiento.

Incluir en el cálculo del promedio de DNP/cerda/año los días de adaptación y de servicios no fecundantes, asociados a las cerdas nulíparas descartadas sin servicio.

- Muerte: contar los DNP desde el último evento exitoso registrado hasta la fecha de muerte.

Tasa de descarte y tasa de reposición

Se entiende por tasa de descarte anual (TDA) al número de hembras descartadas por un establecimiento a lo largo de un año, y como tasa de reposición anual (TRA) a la cantidad de cerdas ingresadas a un establecimiento en un año.

El cálculo puede realizarse sobre el total de cerdas del establecimiento o sobre el total de hembras que son servidas a lo largo del periodo que se desea evaluar (semanal, mensual o anual). Esta última alternativa nos permite obtener una tasa “ajustada” para una mejor planificación del descarte y la reposición de cerdas.

La comparación de la TDA y la TRA entre los diferentes establecimientos suele ser difícil de interpretar debido a que suelen ser calculadas de manera diferente por cada productor. Es importante incluir dentro de los cálculos a las cerdas nulíparas descartadas sin servicio para no generar un sesgo en los resultados.

La TRA y la TDA deben estar equilibradas entre sí y tener valores de entre 35 a 40%. De esta manera logramos mantener constante el inventario de reproductoras y maximizar la productividad. Además de conseguir la estabilidad reproductiva e inmunológica del plantel.

Edad al descarte (herd life)

El *Herd life* (HL) es un índice de longevidad en reproductoras porcinas que indica el tiempo de permanencia de las mismas dentro de la granja. Se expresa como la cantidad de partos al momento del descarte. Es de gran utilidad relacionar el HL con las causas de descarte dado que permite detectar problemas en cerdas jóvenes y evaluar su riesgo de descarte. No es conveniente sólo analizar el valor promedio de HL, dado que el mismo puede estar influenciado por valores extremos. Debería evaluarse la proporción de cerdas de cada edad que componen el descarte, donde el objetivo sería que la mayoría de las cerdas se descarten una vez

cumplido su séptimo u octavo parto. De todos modos un promedio de entre 4 a 6 partos es considerado aceptable.

Bibliografía

- D'Allaire S, Drolet R. En: Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire, Taylor DJ, editores. (2006) Diseases of Swine. 9th ed. Iowa: Blackwell Publishing: 1011-1025.
- Deen J. (2003) Proceedings of the American Association of Swine Veterinarians, Orlando, Florida, EEUU: 147-48.
- Deen J. (2003) Sow longevity measurement. Allen D. Leman Swine Conference: 192-193.
- Engblom L, Selling LE, Lundeheim N, Belák K, Andersson K, Dalin (2008) A. Post mortem findings in sows and gilts euthanised or found dead in a large Swedish herd. Acta Vet Scand, 50:25.
- Heinonen M, Leppävuori A, Pyörälä S. (1998) Evaluation of reproductive failure of female pigs based on slaughterhouse material and herd record survey. Anim Reprod Sci; 52: 235-244.
- Hervias LM, Ayllón S. (2004) Análisis y control de los días no productivos [serial online] Dic [citado 5 Dic 2013]. Disponible en: URL: http://www.3tres3.com/datos_productivos/analisis-y-control-de-los-dias-no-productivos_1045/.
- Sasaki Y, Koketsu Y. (2010) Culling intervals and culling risks in four stages of the reproductive life of first service and reserviced female pigs in commercial herds. Theriogenology; 73: 587-594.
- Soede N, Langendijk P, Kemp B. (2011) Reproductive cycles in pigs. Anim Reprod Sci; 124: 251–258.
- Tummaruk P, Kedsangsakonwut S, Kunavongkrit A. (2009) Relationships among specific reasons for culling, reproductive data, and gross morphology of the genital tracts in gilts culled due to reproductive failure in Thailand. Theriogenology; 71: 369-375.
- Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, editores. (2012) Diseases of Swine 10th ed. Wiley-Blackwell a John Wiley and Sons Inc UK: 5-31.

SECCIÓN IV

Bovinos



PARTE I

Clínica reproductiva bovina

Rodolfo Luzbel de la Sota, Ana Lorena Migliorisi, Laura Vanina Madoz, María Jaureguiberry, Maria Verano Gomez, Walter Gaston Aldabe, Joaquin Chiozza Logroño, Adrián Leopoldo Bottino, Germán Domínguez.



CAPITULO 44

Evaluación de la aptitud reproductiva del toro

Adrián Leopoldo Bottino, Ana Lorena Migliorisi

Se estima que uno de cada cinco toros de una población no seleccionada podría ser subfétil debido a la imposibilidad de servir a la hembra o a una pobre calidad seminal (Barth 2007). La evaluación de la aptitud reproductiva ha sido por varios años el único medio práctico para poder predecir la capacidad reproductiva de los toros de carne (Kennedy y col. 2002). La evaluación de la aptitud reproductiva (EAR) consta de un examen físico-sanitario del animal, un examen genital y un examen del eyaculado, (Rutter y Russo 2006).

El servicio natural a campo en los rodeos de cría, es el más utilizado en la Argentina, siendo el toro uno factor muy importante en cuanto a los resultados reproductivos y productivos de un rodeo. En el año 2014 el rodeo general en la Argentina, según datos de campaña de vacunación antiaftosa, la población de toros y toritos fue de 1.206.212 animales, distribuidos mayoritariamente en la provincia de Buenos Aires (alrededor del 35%)¹.

Dicho examen debe ser realizado en todos los reproductores machos de un rodeo general y a aquellos toros dadores de semen de los centros de inseminación artificial (C.I.A.). Se debe implementar tanto en los animales jóvenes (vírgenes), como en aquellos que estuvieron en servicio o en un C.I.A. y en los animales que se incorporan al rodeo.

¹Fuente: SIGSA- Dirección de Control de Gestión y Programas Especiales. Dirección Nacional de Sanidad Animal- SENASA

Momento de realización de la EAR

Toros jóvenes: la evaluación al destete (5 o 6 meses) se basa principalmente en la medición de la circunferencia escrotal (CE) con el fin de predecir la misma para el año de edad (Tríbulo y col. 2011). La primera EAR completa se debe realizar entre los 12 y 18 meses.

Toros de centro Integrales de inseminación: se debe realizar cada 6 meses en aquellos animales que forman parte del plantel estable.

Toros de rodeo general: en estos animales podemos optar entre diferentes momentos;

a) *Antes del servicio:* se evalúa previo a la entrada de los machos al servicio. Se debe tener en cuenta de contar con el tiempo suficiente para poder reevaluar el animal o poder adquirir otro, en el caso que el macho no sea apto reproductivo.

b) *Post servicio:* la evaluación se realiza luego del retiro de los toros del servicio. Esto permite diagnosticar posibles afecciones adquiridas (en estado agudo o subagudo) durante el servicio. La evaluación post servicio brinda el tiempo suficiente para tratar y reevaluar el animal antes de ingresar al servicio siguiente.

c) *Luego del tacto para diagnóstico de gestación por palpación rectal:* es similar al punto anterior, con la desventaja de que en este caso, no aparecerán afecciones en su estado agudo. Realizar la evaluación en este momento permite poder realizar ambos manejos en pocos días.

En zonas donde no es posible juntar el rodeo con facilidad, y sólo se encierran dos o tres veces al año, se deben aprovechar acciones de manejo y sanitarias conjuntas (vacunaciones, evaluaciones, destetes, etc), siendo éste el momento adecuado de realizar el examen de los toros.

En caso de compra de animales, la EAR se deberá realizar inmediatamente luego de ésta, ya que se cuenta con 30 días como máximos para realizar un posible reclamo.

Pasos de la EAR

1. Reseña
2. Anamnesis
3. Examen clínico general
4. Examen clínico en particular
 - 4.1. Externo
 - 4.2. Interno
5. Examen biológico (semen)
6. Examen funcional
7. Examen sanitario
8. Exámenes complementarios
9. Informe y destino

Seguir ordenadamente los pasos de la EAR. La exploración sistemática ayuda a no olvidar puntos a evaluar y a optimizar el tiempo de trabajo.

1) Reseña

Indica las características que definen al animal. Ésta incluye; raza, edad, peso, identificación del animal y número de registro. En referencia a la raza hay que tener en cuenta que algunos de los parámetros evaluados varían según se trate de razas británicas o indicas, lo que puede llevar a cometer errores.

En el caso que no existan registros de nacimientos, para determinar la edad de los toros de rodeo general, se utiliza la cronología dentaria de los incisivos; 2D, 4D, 6D, 8D y sus diferentes niveles de enrasamiento hasta las categorías de dientes gastados o sin dientes.

Es muy importante la identificación individual de los animales mediante tatuajes, caravanas, caravanas oficiales (SENASA 2006), tanto para la identificación de muestras remitidas al laboratorio como para la emisión del informe de la EAR en el cual la identificación del individuo es esencial.

2) Anamnesis

Consta de la recopilación de información por medio de preguntas realizadas al propietario. Éstas tienen por objetivo obtener información sobre el rodeo en general y sobre el individuo en particular.

De la misma, puede surgir información acerca del porcentaje de toros en servicio en el rodeo, porcentaje de preñez, de destete, etc

3) Examen clínico general

La evaluación clínica debe realizarse tanto *en reposo* como *en movimiento*, considerando el estado general del animal y del aparato locomotor. Primero se lo debe observar en el corral, en movimiento y luego en estación, inmovilizando al animal con un cepo. Una vez inmovilizado, se deben tomar datos de frecuencia respiratoria, cardíaca, temperatura y movimientos ruminales.

Frecuencia Respiratoria	Frecuencia Cardíaca	Temperatura	Movimientos Ruminales en Reposo
15-35/min	60-70/min	38°-39° C	1-2/min

Se deben observar los ollares, por posible presencia de secreciones (siempre tener en cuenta la época del año evaluando el color y la cantidad de la secreción).

Es muy importante la exploración de los *ojos*, los cuales deben estar sanos ya que el toro debe ser capaz de detectar el grupo de hembras sexualmente activo (evidenciado por las montas entre ellas). Deben estar libres de procesos inflamatorios (queratocconjuntivitis) o tumores del tercer parpado, con mayor predisposición en razas como la Hereford por tener piel despigmentada alrededor de los ojos.

La *dentición* es otro de los aspectos a evaluar. Se debe observar el desgaste dentario, que indica no sólo la edad del animal sino brinda información sobre la alimentación que recibió ese animal (Foto 1). En zonas donde los pastos son más duros el desgaste dentario es mucho mayor y se descartan animales más jóvenes.

La exploración del *aparato locomotor* es un punto crítico de la evaluación, se debe observar la columna y el tren posterior en su conjunto, la conformación ósea y por ende los aplomos en busca de posibles defectos que lleven a descartar el animal. Se debe tener en cuenta que durante la monta, específicamente durante el abrazo, eyaculación y estocada el toro queda suspendido en el aire y cae con todo su peso sobre sus miembros posteriores, por lo tanto el apoyo debe ser el adecuado (Rutter y Russo 2006). Los malos aplomos son una característica de alta heredabilidad 0,67 e indeseable, por lo cual un animal que presente problemas de aplomos se debe descartar en este momento de la exploración. Otro punto a tener en cuenta es la conformación y forma de las pezuñas.

Otro de los parámetros a evaluar es la *condición corporal* (CC); se realiza observando las apófisis trasversas, las tuberosidades coxales e isquiáticas, los músculos del lomo y la base de la cola, considerando 1 punto como muy delgado y 5 puntos como muy gordo, con valores intermedios de 0,25. Se espera un ideal de 3,5 de CC al momento del servicio. Durante los meses en reposo sexual los toros deben permanecer en potreros con buena disponibilidad de forraje, ya que deben estar en muy buen estado al entrar en la temporada reproductiva (Acuña 2014) debido a que pierden hasta 1 a 1,5 puntos de condición corporal durante el servicio.

4) Examen clínico particular

Dicho examen comprende la exploración de los órganos sexuales externos e internos.

Exploración externa: corresponde a la inspección y palpación de los órganos genitales externos.

- Escroto,
- Testículos, y medición de circunferencia escrotal,

- Epidídimos,
- Cordón espermático,
- Prepucio
- Pene.

Exploración interna: corresponde a la palpación de las glándulas anexas y anillos inguinales y se realiza por medio de la palpación rectal.

- Uretra pelviana,
- Próstata,
- Glándulas Vesiculares,
- Ampollas de los conductos deferentes,
- Anillos inguinales.

Durante la exploración se deben inspeccionar los órganos en forma minuciosa, se deben tomar medidas y palpar, constatando la presencia del órgano inspeccionado, desarrollo en base a edad, y según el órgano, su forma, simetría con su contralateral, consistencia, movilidad, sensibilidad y temperatura.

Exploración externa

Escroto: para realizar esta exploración, el operador debe colocarse desde caudal en una posición de cuclillas con una pierna adelante y otra atrás. Se realizara una primera inspección visual para observar el largo, forma y contenido dentro del escroto, es importante observar el cuello del escroto e identificar si es evidente; en caso de no serlo, puede indicar la presencia de tejido adiposo. La bolsa escrotal sostiene los testículos a una temperatura entre 2 a 5 °C menos de la corporal, para que la espermatogénesis se desarrolle con normalidad. (Rutter y Russo 2006). Por lo que la piel debe ser delgada, y provista de pelos cortos, con glándulas sudoríparas que le permiten perder temperatura, debiéndose observar la presencia de heridas, laceraciones, dermatitis, reacciones de hipersensibilidad o ectoparásitos. El escroto debe permitir el correcto ascenso y descenso de los testículos a través de la túnica dartos y del músculo cremaster externo, ayudando a la termorregulación (Senger 2003). Es importante que no existan adherencias que afecten el correcto ascenso y descenso de los testículos. El plexo pampiniforme ayuda a disminuir la temperatura de la sangre que irriga al tejido testicular.

Testículos: La posición del operario es la misma que la utilizada para la inspección del escroto. Para realizar la inspección y palpación se debe sujetar la base del escroto y desplazar los órganos hacia distal y caudal. Se debe evaluar la simetría, forma, posición y tamaño y luego

en forma bi-manual se debe realizar la palpación determinado la consistencia, desplazamiento dentro del escroto y temperatura. La forma de los órganos es alargada y oval (abollonada), y su posición vertical. El tamaño es variable según la edad, la raza y la presencia de lesiones. Los toros de un año con testículos pequeños no logran desarrollarse con el tiempo y sus testículos serán igualmente pequeños a los dos años de edad (Cates, 1981; citado por Rutter y Russo, 2006).

A los 24 meses de edad los testículos estarán en un 90% de su tamaño de animal maduro en un *Bos taurus* bien alimentado. La *circunferencia escrotal* (CE) es un factor esencial en la evaluación de la aptitud reproductiva de un toro, ya que es el indicador utilizado para determinar el tamaño testicular, y está relacionado directamente con el potencial de producción de espermatozoides. Además, la CE es mejor predictor de la pubertad que el peso o la edad del animal (Barth 2007). La medición de la CE se realiza mediante cinta métrica (escrotímetro) en el ecuador de los testículos descendidos hacia al fondo de la bolsa escrotal (Foto 2), ésta posee una correlación positiva con la maduración sexual (pubertad) más temprana de su descendencia (precocidad), así como con la calidad seminal (bajo porcentaje de anomalías primarias) y la producción diaria de espermatozoides. Los valores esperados según la Sociedad de Teriogenología de los Estados Unidos (Kennedy y col. 2002) son:

- <15 meses de edad= ≥ 30 cm
- 15-18 meses de edad: ≥ 31 cm
- 19-21 meses de edad: ≥ 32 cm

La consistencia testicular se evalúa mediante la palpación bimanual y es tenso-elástica, la misma puede estar alterada por procesos patológicos y encontrarse disminuida o aumentada, ya sea en un sector o en todo el órgano. La misma refleja la composición del parénquima testicular y las capas que lo rodean. La ausencia de adherencias se puede evidenciar al poder deslizar y desplazar ambos testículos dentro de la bolsa escrotal. Las principales alteraciones que se pueden hallar son: la hipoplasia testicular, como principal anomalía congénita; y la degeneración testicular, la atrofia uni o bilateral y la orquitis dentro de las anomalías adquiridas. En raras ocasiones se pueden hallar tumores como el tumor de células de Sertoli.

Epidídimos: Estos órganos son los encargados de transportar los espermatozoides desde los testículos hasta los conductos deferentes. Se dividen en tres partes: cabeza, cuerpo y cola. Están formados cada uno por un túbulo sinuoso y plegado de aproximadamente 35 metros y el mayor almacenamiento de espermatozoides se produce en la cola del epidídimo. La cabeza recubre el polo dorsal del testículo hacia el lateral. La exploración de dichos órganos se realizará individualmente, ascendiendo el testículo opuesto y liberando el epidídimo para su palpación. La cabeza debe ser simétrica y de consistencia tenso-firme-elástica, y no poseer

movilidad. El cuerpo se ubica caudo-medial del testículo en dirección dorso ventral, es un cordón de 0,5 a 1 cm de ancho, debe ser simétrico y no desplazable. La cola se ubica en el polo ventral del testículo y es de forma esferoide, de 1,5 a 3 cm dependiendo de la raza y edad (Grossman 1982). Debe ser simétrica con su contralateral y su consistencia tenso elástica. Los posibles hallazgos patológicos pueden comprender aplasia total o segmentaria, hipoplasia, granuloma espermático o epididimitis. Solamente la reserva de espermatozoides alojados en la cola del epidídimo y ampolla de los conductos deferentes son utilizados para la eyaculación (Rutter y Russo 2006).

Cordón Espermático: está compuesto por vasos sanguíneos y linfáticos, nervios, músculo cremaster y conducto deferente. Se encuentra directamente relacionado con la termorregulación. La evaluación del cordón espermático consiste en una inspección y palpación, evaluando estructuras, simetría y presencia de deformaciones causadas por hernias, hidroceles o adherencias.

Prepucio: la exploración debe realizarse desde lateral del animal. Posee una longitud de aproximadamente de 40 cm en un *Bos taurus* y de 60 cm en un *Bos indicus*, con un diámetro de 3 a 4 cm (Foto 3). El orificio prepucial en condiciones normales permite la introducción de hasta dos dedos. Según la raza, pueden encontrarse pegados al cuerpo o péndulos como el caso de las razas índicas y sus cruas. Aquellos que son demasiado péndulos no son deseables porque están propensos a sufrir heridas y lesionar el pene, alterando la monta. Para poder evaluar el grado de separación del cuerpo se debe trazar una línea imaginaria horizontal que pase del tarso al garrón, y el prepucio no puede descender más allá de dicha línea. Se debe evaluar la piel, integridad de la misma y no deben aparecer heridas. La mucosa se evalúa mientras se produce la protrusión del pene. No debe presentar deformaciones ni úlceras o procesos inflamatorios. A la palpación el prepucio no debe tener adherencias que afecten la exteriorización del pene. Algunos de los hallazgos patológicos más comunes de presentarse en el prepucio son la fimosis o la para fimosis.

Pene: se debe inspeccionar desde lateral, para observar posibles deformaciones como los hematomas peneanos o abscesos. Éstos últimos pueden localizarse a lo largo del órgano y los hematomas generalmente a la altura de la flexura sigmoidea. La palpación del glande y la flexura se realizan a través del prepucio. Para poder realizar una correcta exploración del pene, se debe realizar al momento de realizar la extracción de semen (Alexander 2014). Al momento de la exteriorización del pene, se debe sujetar desde el glande con una gasa y finalizar la exteriorización de forma manual. Otra forma de poder evaluarlo es al momento de realizar el examen funcional o prueba de capacidad de servicio, en la cual se observara la conformación, desviaciones, presencia de frenillo persistente, laceraciones, y tumores (fibropapilomas). Además se puede observar la exteriorización y re- intromisión y certificar la ausencia de fimosis

o parafimosis. Otra de las formas de poder exteriorizar el pene es mediante la aplicación de xilacina al 2 %, según la dosis podrá realizarse con el animal en pie o en decúbito. (Rutter y Russo 2006)

Exploración interna

La evaluación de los órganos genitales internos se realiza a través del tacto rectal y utilizando la uretra pelviana como referencia anatómica. La uretra pelviana está ubicada en el piso de la pelvis recubierta por el músculo uretral , y tiene un diámetro de entre 3 y 4 cm . Todas las estructuras a palpar se encuentran dentro de la cavidad pelviana.

Glándulas. bulbouretrales: estas glándulas son muy pequeñas en el toro y no son palpables. Miden aproximadamente unos 3 cm de diámetro.

Próstata: está compuesta por un cuerpo y una porción diseminada que no es palpable. El cuerpo se encuentra rodeando a la uretra y se palpa como un anillo sobre la uretra pelviana. No es asiento de alteraciones patológicas de importancia.

Glándulas. vesiculares: son las estructuras de mayor desarrollo y de importancia clínica en el toro. Aportan la mayor parte del plasma seminal, su secreción es rica en nutrientes y tiene un pH de 5,7 a 6,2. Son dos formaciones alargadas de 8 a 15 cm de largo según raza y edad. Poseen una porción fija caudal que se une a la uretra y una porción craneal libre y lobulada .Se debe evaluar la simetría, la consistencia, que es similar a la del borde cubital de la mano, la presencia de adherencias y la posible pérdida de las lobulaciones, en el caso de presentar un proceso inflamatorio (seminovesiculitis). En animales adultos, esta afección constituye un problema crónico, de difícil resolución que afecta la calidad del semen con excreción de material purulento en el eyaculado que disminuye la fertilidad del animal (Vásquez SD).

Anillos Inguinales internos: Se encuentran en la región abdominal, cerca del borde craneal del pubis, sobre la pared craneo-lateral. Una vez ubicados se intentara introducir un dedo por el trayecto inguinal, en caso de que puedan introducirse más de un dedo, el animal tendrá predisposición a tener hernias inguinales.

5) Examen biológico del semen

Se tratará en el capítulo siguiente

6) Examen funcional

Dicho examen consiste en la evidencia de que el animal es capaz de realizar una monta efectiva. Se evalúa la libido, entendida como el deseo sexual, y la capacidad para la monta. La expresión de la libido varía entre toros está fuertemente influenciado por la genética, además no existe ninguno de los parámetros anteriores que estén relacionados con ésta, por lo tanto es importante poder determinar que el toro muestre interés sexual por la hembra. En la práctica hay diferentes métodos para evaluar estos ítems, pero el punto de interés se basa en la observación de la respuesta del animal frente al estímulo de la hembra, ya sea inmovilizada o en celo, observando el tiempo transcurrido desde la presencia del estímulo hasta la primera monta y la cantidad de montas completas e incompletas en un período determinado de tiempo (Chenoweth P 1981).

7) Examen Sanitario

El examen sanitario incluye el diagnóstico de las enfermedades de transmisión sexual (venéreas) como lo son la Trichomoniasis y la Campylobacteriosis. Éste se debe realizar mediante la toma de muestra de esmegma prepucial por medio de raspadores ya sean metálicos o descartables. Para tomar la muestra el toro debe tener un reposo sexual de 30 días como mínimo. La técnica consiste en introducir el raspador por el orificio prepucial hasta el fondo de la cavidad y realizar movimientos cráneo-caudales tomando contacto con la mayor superficie de mucosa posible. Luego se debe introducir y enjuagar el mismo en el medio de transporte que será transportado al laboratorio para el diagnóstico. Se deben tomar 3 a 4 muestras prepuciales con un intervalo de 7 a 10 días. En cuanto a la *tricomoniasis*, un toro positivo indica un rodeo positivo. No se recomienda tratamiento y se debe eliminar el animal. Con respecto a la campilobacteriosis, existe la vacunación y el tratamiento con dehidroestreptomicina por vía local y sistémica, aunque lo aconsejable es eliminar el toro. (Rutter y Russo 2006).

Se deben realizar los diagnósticos para Brucelosis por medio de la toma de muestra de sangre y el diagnóstico de Tuberculosis por medio de la prueba de tuberculina.

Es importante manejar un rodeo sanitariamente libre de enfermedades tales como las antes mencionadas, y mantener un control sobre enfermedades como; la leptospirosis, la paratuberculosis, la leucosis, el complejo diarrea viral bovina y el Herpes 1.

8) Exámenes complementario

Éstos pueden incluir:

Ultrasonografía para evidenciar o confirmar lesiones tanto a nivel testicular como de glándulas anexas. Es posible evidenciar áreas de calcificación, degeneración o necrosis a nivel testicular y a nivel de glándulas vesiculares evidenciar procesos inflamatorios incipientes.

Biopsia testicular con el fin de diagnosticar en forma fehaciente algún proceso patológico que esté afectando la espermatogénesis. Se ha demostrado que esta técnica no produce mayores alteraciones y que es segura bajo las condiciones adecuadas (Heath y col. 2002).

9) Informe y destino

La clasificación del animal puede ser:

- Apto
- No Apto
- Diferido

Con la clasificación de *apto*, se considera que el toro está en condiciones de entrar a servicio y potencialmente servir a las hembras del rodeo. El animal determinado como *no apto*, no debe entrar a servicio y debe ser descartado como reproductor. Y el animal clasificado como *diferido*, debe ser tenido en cuenta para una reevaluación posterior, dependiendo el tiempo a realizar la misma, de la causa por la que obtuvo dicho estado.

Es muy importante aclarar en este punto que el resultado de la EAR permite determinar el *potencial reproductivo* del animal. La EAR no es una prueba de fertilidad, sino una *estimación de la fertilidad potencial* del animal evaluado.

Bibliografía

- Acuña, C. (2014). "Uso eficiente durante el servicio natural". En Marcantonio, S. *Septimas Jornadas Taurus*. Buenos Aires, Argentina: .
- Alexander, J. H. (2014). "Evaluation of Breeding Soundness: The Physical Examination". En *Bovine Reproduction*. (pp. 64-67). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Barth, A. D. (2007). "Evaluation of Potential Breeding Soundness of the Bull". En *Current therapy in large animal theriogenology*. (pp. 228-240). Philadelphia, Pennsylvania, USA: W.B. Saunders Company.
- Chenoweth P, J. (1981). "Lybido and mating behavior in bulls, boars and rams - A review ". *Theriogenology* 16 (2), pp. 155-177.
- Grossman, J. D. y. S., S. (1982). *Anatomía de los animales domésticos* (5º). España:
- Heath, A. M., Carson, R. L., Purohit, R. C., Sartin, E. M., Wenzel, J. G. y Wolfe, D. E. (2002). "Effects of testicular biopsy in clinically normal bulls". *J Am Vet Med Assoc* 220 (4), pp. 507-12.
- Kennedy, S. P., Spitzer, J. C., Hopkins, F. M., Higdon, H. L. y Bridges, W. C., Jr. (2002). "Breeding soundness evaluations of 3,648 yearling beef bulls using the 1993 Society for Theriogenology guidelines". *Theriogenology* 58 (5), pp. 947-61.
- Rutter, B. y Russo, A. F. (2006). *Bases para la Evaluación de la Aptitud Reproductiva del Toro*. Buenos Aires: Agro Vet.
- SENASA (2006). "Resolución Senasa 754/2006". [En línea]. Consultado 21/02/2015 en <http://www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=1029&io=4837>.
- Senger, P. L. (2003). *Pathways to pregnancy and parturition*. (Second Edition). Pullman, Washington:
- Tríbulo, H. E., Alonso, N., Bó, G., Brogliatti, G. M., Caccia, M. y Carcedo, J. (2011). *Capacidad Reproductiva del Toro*. IRAC-Instituto de Reproducción Animal Córdoba.
- Vásquez, L. A. (SD). "Evaluación del Potencial Reproductivo del Toro". [En línea]. Consultado en <http://www.rebiotec.com.ve/evaluacion.pdf>.



Foto 1: Boqueo en el cepo

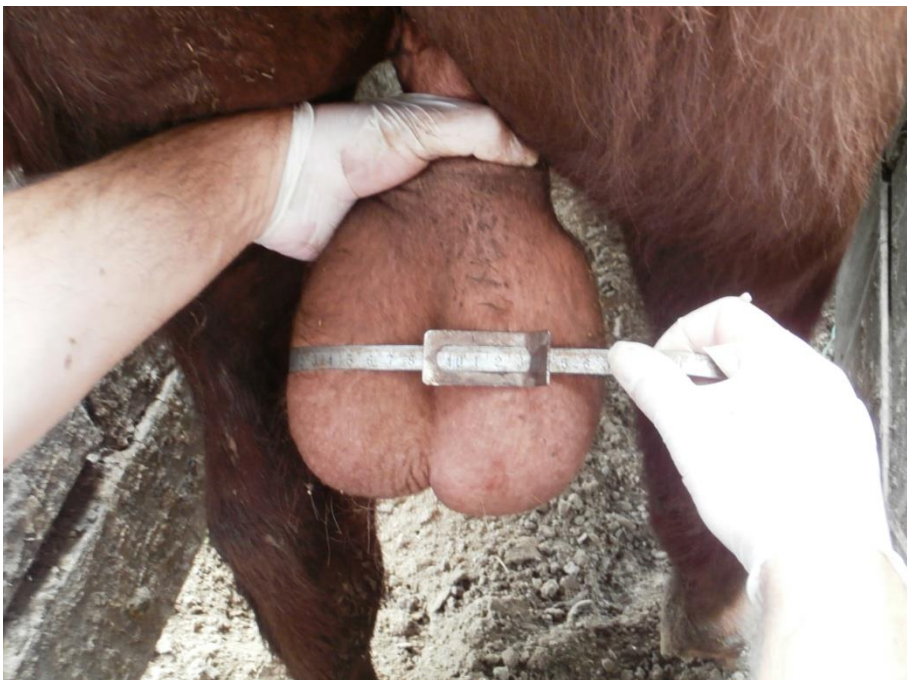


Foto 2: Medición de circunferencia escrotal



Foto 3: Palpación de prepucio y pene

CAPÍTULO 45

Examen biológico del semen: evaluación de semen en bovinos

Ana Lorena Migliorisi, Maria Verano Gómez, Laura Vanina Madoz

Previo a describir los pasos para una correcta evaluación seminal, se debe tener en cuenta que existen dos tipos de evaluaciones, la del semen fresco, como parte de la Evaluación de la Aptitud Reproductiva (EAR) y la del semen congelado-descongelado para constatar la calidad de la muestra previo a la inseminación.

A continuación se describirán los pasos a seguir para realizar la extracción y evaluación del semen fresco, que es uno de los pasos en la determinación de la EAR del toro. Los parámetros utilizados como estándar son los que determina la Sociedad de Teriogenología de los EEUU.

Evaluación de semen fresco

La evaluación del semen es un punto importante para la certificación de la aptitud reproductiva en un toro y por lo que los resultados de las pruebas de laboratorio deben considerarse cuidadosamente. Errores en el manejo de la muestra pueden llegar a alterar las características del material seminal y dar lugar a una falsa interpretación de la calidad del mismo (Rutter y Russo 2006). Otro de los factores a tener en cuenta es que no es posible

rechazar un animal por baja calidad seminal evaluando un solo eyaculado, en el caso que no supere los parámetros mínimos se debe reevaluar a dicho animal al menos tres veces.

Obtención de la muestra seminal

El semen se puede obtener por medio de masaje transrectal, electro-eyaculación (EE) (Foto 1) o por medio de una vagina artificial (VA) (Foto 2). En todos los casos, el semen es recolectado en un tubo graduado de 15 ml aproximadamente, para facilitar la medición del volumen. Se debe cubrir el tubo con un protector para evitar que, tanto los rayos UV como los cambios bruscos de temperatura afecten a la calidad de la muestra.

Masaje transrectal

El masaje transrectal se realiza con una mano enguantada estimulando la zona de las glándulas vesiculares. Esta técnica ha demostrado ser efectiva y era la única posibilidad de extracción de semen sin tener que utilizar una vagina artificial o aspirar el eyaculado desde la vagina luego de la monta. Sin embargo posee variable respuesta y resulta en más esfuerzo para el operador. Hoy es utilizada previo a la introducción de la sonda transrectal del electroeyaculador porque demostró que reduce la cantidad de estímulos necesarios y el tiempo hasta la obtención de la muestra (Palmer y col. 2004).

Electroeyaculación

El método consiste en la aplicación de estímulos eléctricos transrectales por medio de una terminal que estimula la zona de las glándulas vesiculares (Palmer y col. 2005). Su principal ventaja es que permite obtener muestras de toros sin entrenamiento previo por lo que se utiliza principalmente en los animales de rodeo general, aunque también es de elección para aquellos que animales de centro de inseminación que no respondan a la técnica de vagina artificial o estén cursando por una impotencia coeundi extragenital adquirida como puede ser un pietín, una lumbalgia o estén convalecientes de una fractura.

Se debe extraer la mayor cantidad de materia fecal del recto para que la terminal contacte en la mayor superficie posible con la mucosa. Existen equipos automáticos o manuales, en los cuales los estímulos son regulados, tanto en intensidad como en frecuencia, por el operador. Los equipos automáticos tienen una curva de trabajo que va aumentando en intensidad y frecuencia sólo con presionar un comando. En la curva automática para la extracción de semen en bovinos el voltaje va de 0 a 20 Volts con incrementos de a 0,5. Los ciclos de estimulación son de aproximadamente 2 segundos de estímulo y 2 segundos de descanso. Una vez obtenida la muestra se debe interrumpir la curva.

La estimulación se debe continuar hasta obtener una muestra, si la misma no se pudo obtener, se puede volver a realizar la técnica luego de que el animal tenga un período descanso (Tríbulo y col. 2011).

Vagina Artificial

Este método de recolección se usa casi exclusivamente en centros de inseminación artificial se dice que es un método de extracción de semen para fisiológico, ya que respeta la mayoría de los reflejos de la cadena de reflejos sexuales del toro. Algunos de los principales factores a tener en cuenta para aplicar dicho método son: las características individuales de cada animal, (aquellos seleccionados para la extracción deben ser dóciles), el entrenamiento para el salto, disponer de un súcubo, lugar adecuado para la recolección, la pericia del operador y correcta preparación de la vagina artificial entre otros (Rutter y Russo 2006).

El modelo de VA más utilizado en bovinos es el Danés y consta de un tubo de goma rígido exterior de un largo que va entre los 30 y 40 cm y que posee un orificio para cargar el agua caliente cerca de uno de los extremos. Interiormente se recubre con una camisa de goma o

látex que es de mayor longitud que el tubo de goma. Ambos extremos de dicha camisa se pliegan sobre el tubo de goma creando un espacio entre estas dos estructuras que se llena con agua caliente a una temperatura de entre 42 y 46°C. En uno de los extremos se coloca un cono de goma o látex que finaliza en un tubo de recolección, el cual puede ser plástico o de vidrio. (Garner 1991),(Rutter y Russo 2006).

Examen biológico del semen

Es importante tener en cuenta que al momento de evaluar las muestras en el laboratorio se debe contar con todo el material listo para trabajar (Foto 3). El baño térmico debe estar conectado y atemperado, ya que tarda unos minutos en estabilizar la temperatura requerida (32-35°C), dentro del mismo se deben colocar tubos con el diluyente para la evaluación y la tinción vital. Se debe conectar la platina térmica del microscopio y colocar sobre ella los portaobjetos necesarios para realizar la evaluación y los extendidos. Se recomienda realizar dos extendidos por muestra y tenerlos previamente rotulados con el nombre del animal y la fecha. Preparar siempre el material de laboratorio sobre la mesada en forma ordenada y contar con la planilla de evaluación para no olvidar ningún paso. Una vez que el semen llega al laboratorio, se debe colocar en el baño térmico para comenzar con su evaluación (Foto 3).

La evaluación del semen fresco en el toro se puede dividir en *Macroscópica*, *Microscópica* y *Pruebas bioquímicas*.

Evaluación Macroscópica

Volumen: se observa directamente sobre el tubo graduado, teniendo en cuenta que un toro mayor de 2 años debe tener un eyaculado de no menos de 4ml. El volumen puede variar entre 2 y 12ml. Este parámetro se encuentra afectado por la técnica de EE por lo tanto no es confiable su medición, sin embargo si es posible recuperar varios mililitros de muestra, significa que el individuo es capaz de producir un buen eyaculado (Barth 2007).

Color: se consideran normales los colores que van del blanco al amarillento, siendo patológicos, los colores rosado, amarronado y verdoso (Rutter y Russo 2006).

Densidad: la densidad del semen varía desde un semen acuoso, lechoso, lechoso-cremoso, hasta un cremoso, estando directamente relacionada con la concentración. Este parámetro, al igual que el volumen se pueden ser afectados por el método de extracción por EE y se debe tener cuidado con su interpretación. La densidad de la muestra está directamente relacionada con la concentración y se la puede clasificar según el siguiente cuadro (Barth 2007).

MB = Cremoso, espeso 750.000 esp/mm³
B = lechoso, 400 a 750.000 esp/mm³
R = leche aguachenta, 250 a 400.000 esp/mm³
P = traslucido, menos de 250.000 esp/mm³

Cuerpos Extraños: se evalúa observando el fondo del tubo para detectar la presencia de algún cuerpo extraño, se considera como positivo en el caso de presencia o negativo en el caso de presentarse la muestra limpia

Evaluación Microscópica

Motilidad espermática: la evaluación de la motilidad se debe realizar a la brevedad luego de la extracción, ya que va disminuyendo con el correr del tiempo. Asimismo, la motilidad depende del pH, la osmolaridad del medio, la temperatura y la adecuada concentración de iones y nutrientes del plasma seminal. Se debe tener en cuenta que puede ser inhibida o reducida fácilmente por contaminación del material de recolección, ya sea por residuos de detergentes o contaminación con orina o cuerpos extraños al momento de la colecta. Las temperaturas ambiente extremas o la falta de atemperado del material son también factores que afectan a la motilidad (Barth 2007).

Motilidad en Masa Microscópica (MMMi): se coloca una gota del semen puro sobre un portaobjetos atemperado a 36-37°C, sobre una platina térmica de microscopio, y se lo observa a aumento de lupa con una magnificación de 40x, evaluando la presencia de movimiento en forma de ondas omega. Se debe evaluar cerca del borde de la gota, donde la profundidad de la

misma es menor y es más fácil de observar. La escala que se toma es de 1 a 5, evaluando como 1 al semen que no presenta ondas y 5 cuando las ondas se mueven rápidamente formando remolinos. Dentro de esos parámetros se consideran los puntos intermedios. Se considera como valor mínimo de aceptación 3 de MMMi (Rutter y Russo 2006). Otra forma de clasificar la motilidad en masa es según el siguiente criterio (Barth 2007):

Muy buena (MB): movimiento en ondas veloz formando remolinos

Buena (B): remolinos lentos

Regular (R): no hay remolinos, pero se observa movimiento individual.

Malo (M): escaso o nulo movimiento.

La motilidad masal depende de *tres* factores que son; la *concentración*, el *porcentaje de movimiento progresivo* y la *velocidad o vigor* de los espermatozoides. Si la MMMi es B o MB, significa que los tres factores antes mencionados tienen valores aceptables. Sin embargo, si cualquiera de estos tres factores está comprometido, este dato se ve afectado y se debe progresar con la evaluación de la motilidad individual y vigor, para determinar el factor que se encuentra disminuido. Una situación posible es que, si la muestra tiene baja concentración espermática, posea una MMMi mala, aunque los valores de motilidad individual y vigor sean excelentes, ya que se encuentra muy diluido.

Motilidad individual (MOT): es muy probable que para poder ver el movimiento individual de los espermatozoides sea necesario diluir la muestra y se debe hacer con una solución isotónica con el plasma seminal. Se utiliza una solución de citrato de Na al 2.92% y ésta debe estar a la misma temperatura del semen, ya en el baño térmico. Se coloca una gota de la muestra diluida sobre un portaobjetos atemperado a 36-37°C, sobre ésta un cubreobjetos, también a la misma temperatura y se observa al microscopio, siempre sobre la platina térmica, con una magnificación de 400 X. Se deben observar entre dos y tres campos y valorar subjetivamente los espermatozoides que se mueven en forma *rectilínea progresiva*, siendo éstos los que atraviesan el campo de observación. Los espermatozoides que giran en círculo o avanzan en forma oscilatoria, se consideran que tienen movimientos anormales. El porcentaje que se indica es el de los espermatozoides con movimiento rectilíneo progresivo del total de los espermatozoides, siendo el valor mínimo aceptable para un toro de rodeo general del 60 %. Según el porcentaje de espermatozoides móviles, la MOT se puede clasificar a su vez en cuatro categorías (Barth y Waldner 2002):

MB = 80-100%

B = 60-79%

R = 40-59%

P = menos de 40%

Vigor (VIG): es una medida del grado de intensidad del movimiento progresivo rectilíneo (Rutter y Russo 2006) y se evalúa al mismo tiempo que la MI, teniendo en cuenta la velocidad con la que éstos espermatozoides atraviesan el campo. La escala que se utiliza es de 0 a 5, evaluando como 0 los espermatozoides inmóviles y como 5 los que avanzan rápidamente por el campo y son difíciles de seguir visualmente. Dentro de estos parámetros se consideran los puntos intermedios. Se considera como valor mínimo aceptable un vigor de 3.

Concentración (CON): la cantidad de espermatozoides por unidad de volumen se puede medir en forma automática en un contador automático por densidad óptica o manualmente por medio de una cámara cuentaglóbulos. Previo al conteo con uno u otro método se debe diluir el semen en una proporción justa de acuerdo al método elegido. Para la evaluación en la cámara cuentaglóbulos de Neubauer modificada, se debe diluir la muestra de semen en una solución salina formolada al 2% en una proporción de 1/200. Para preparar la cámara, se deben humedecer los bordes de ésta antes de colocar el cubrecámara. Luego se debe presionar ejerciendo una leve fricción para que ambas partes queden unidas y al invertir la cámara, no se separen. Una vez homogeneizada la dilución, se toman aproximadamente 12 µl y se cargan por capilaridad ambos retículos, teniendo en cuenta de cargar otros 12 µl para el segundo retículo volviendo a homogeneizar entre una carga y otra. Luego se debe dejar reposar unos minutos para permitir que todos los espermatozoides decanten y se ubiquen en un mismo plano para poder contarlos. El conteo se realiza en el retículo central de glóbulos rojos con una magnificación de 400X. Se cuentan todos los espermatozoides que se encuentren en las cuatro cuadrículas de las puntas y la central (5 en total de 25 cuadrículas totales). Se cuentan los retículos de ambos lados de la cámara y se saca el promedio. El número de espermatozoides contados se multiplica por 10 millones (*) y se obtiene la cantidad de espermatozoides por milímetro cúbico de semen. La concentración seminal para un toro de rodeo general no debería ser inferior a 500.000 esp/mm³.

(*)Factor de corrección: es igual a la inversa de la dilución por la inversa de la profundidad de la cámara por el total de cuadrículas pequeñas que posee el retículo, dividido el número de cuadrículas pequeñas que cuento en las 5 cuadrículas grandes. $200 \times 10 \times 400 / 80 = 10000$

Coloración Vital (PVIV): por medio de esta técnica se determina el porcentaje de espermatozoides con membrana intacta a través de la realización de un frotis con una coloración de eosina-nigrosina. Se realiza extrayendo una gota de aproximadamente 10 µl de semen puro y colocándola sobre la punta de un portaobjetos limpio y desengrasado atemperado a 36,-37°C, sobre esta gota se coloca una gota aproximadamente 30 µl de la tinción, que debe estar a la misma temperatura del semen. Se mezcla suavemente con la punta de la pipeta por 20 segundos y luego se realiza el extendido. Se deja secar sobre la platina térmica y se procede a su lectura (Foto 4). *Nota:* El *fundamento* de esta técnica es el siguiente: El colorante penetra la membrana de los espermatozoides con membrana dañada o muertos, dejando sin teñir los que se encuentran con la membrana celular intacta o vivos al momento de realizar la tinción. Para calcular el porcentaje de espermatozoides vivos se procede a observar

el frotis con una magnificación de 400X, contando en guarda griega todos los espermatozoides de cada campo evaluado, discriminando los que están teñidos, como muertos y los sin teñir como vivos. Se cuentan no menos de 100 células y se saca el porcentaje. Se considera como valor mínimo aceptable 70% de espermatozoides vivos. La lectura del frotis de coloración vital debe realizarse el mismo día de la extracción, ya que si no se corre el riesgo de que todos los espermatozoides se tiñan.

Morfología espermática: El espermatozoide bovino tiene una longitud de entre 68 y 74 μm y está formado por cabeza, cuello, pieza intermedia y cola. La cabeza, en su parte anterior está recubierta por el acrosoma.

Integridad de acrosoma (ACRO): se puede evaluar a través de un frotis teñido con Giemsa, en gota húmeda en un microscopio de contraste de fases o con una tinción fluorescente de PSA. En todos los casos lo que se observa es la presencia o ausencia del capuchón acrosomal, y en el caso de que se encuentre presente se evalúa que se encuentre homogéneo, sano, con su forma normal y que no posea vacuolas ni esté tumefacto. El valor mínimo aceptable para animales de rodeo general es de 70% de acrosomas normales.

Morfoanomalías: se debe realizar un frotis, fijarlo y teñirlo; hay diferentes tinciones que son efectivas. La tinción de Giemsa que se utiliza para evaluar la integridad del acrosoma se puede utilizar también para evaluar la morfología, otra tinción efectiva es la Tinción 15, o la tinción de eosina-nigrosina que se utiliza para la evaluación de la integridad de membrana. Las malformaciones espermáticas, se pueden clasificar siguiendo diferentes criterios:

a) **Primarias y Secundarias:** es la clasificación más usada en la bibliografía, pero no por ello la más exacta. Las malformaciones primarias son aquellas que se originan dentro del testículo durante la espermatogénesis y las malformaciones secundarias son aquellas que se originan dentro del epidídimo. Cabe destacar que por definición se denota el origen y no la severidad del defecto.

b) **Mayores y Menores:** esta clasificación la propuso Bloom en 1977 y llamó malformaciones mayores a aquellas que estaban asociadas con infertilidad y malformaciones menores a aquellas que, al momento de crear el método de clasificación, no se encontraban relacionadas con la fertilidad en forma directa.

c) **Compensables y No Compensables:** en 1994 Saacke y col. propusieron clasificar los defectos como compensables a aquellos en los que el espermatozoide no llega a la vecindad del ovocito y no evita que otro espermatozoide realice la fertilización; por lo tanto si se aumenta la concentración de la dosis seminal, se podría llegar a compensar este tipo de malformación, tal es el caso de espermatozoides con problemas en el sistema de locomoción. Un defecto no compensable es aquel en el cual el espermatozoide está perfectamente capacitado para llegar hasta el ovocito, realiza el bloqueo de la polispermia pero es incapaz de continuar el proceso de fertilización. Dicho defecto no se puede compensar aumentando la concentración de la dosis inseminante, ya que si una muestra posee un 20% de espermatozoides con este defecto, no habrá ninguna diferencia si hay 100, 1.000 o 10.000 en el oviducto, siempre tendríamos

20% de chances de que un espermatozoide con este tipo de defecto inicie la reacción acrosómica y bloqueo de la polispermia. Tal es el caso de espermatozoides con vacuolas nucleares (defecto de diadema).

En la actualidad, quizás lo más adecuado sea identificar cada una de las anomalías por su ubicación dentro de la estructura del espermatozoide y la relación de cada una de ellas con la fertilidad, para lo cual aún se requieren muchos estudios para poderlo dilucidar fehacientemente en todos los casos (Barth 2007). En general el número máximo de anomalías de cabeza aceptable se encuentra entre un 15 y un 20%. Con respecto a las anomalías de acrosoma y cola se puede aceptar hasta un 25%. Fuese cual fuese el sistema de clasificación, en ninguno de los casos se debe esperar un mínimo de 70% de espermatozoides normales en el eyaculado para poder aceptar un toro como apto reproductivo en cuanto a su semen, tanto para rodeo general, como para congelar.

Pruebas bioquímicas

En el caso de los toros, la prueba bioquímica que se realiza de rutina como parte del examen biológico del semen es el pH. En otras especies domésticas existen otras pruebas que son explicadas en cada capítulo específico, como lo es la prueba de la fosfatasa alcalina.

pH: se evalúa extrayendo una gota de semen del tubo y colocándola sobre una tira indicadora de pH. Se considera un pH normal, entre 6.2 y 6.8. Los espermatozoides necesitan de un pH adecuado para conservar su motilidad por el mayor tiempo posible.

Interpretación de los resultados

La evaluación de la muestra seminal nos permite obtener el equivalente a una “biopsia” del testículo, por lo tanto con la interpretación del espermograma anormal, podemos diagnosticar, brindar tratamiento y dar el pronóstico reproductivo de ese animal (Barth 2007). Dicha evaluación, junto con la interpretación de evaluación clínica reproductiva y del examen sanitario permite determinar si el animal está apto reproductivo.

Bibliografía

- Barth, A. D. (2007). "Evaluation of Potential Breeding Soundness of the Bull". En *Current therapy in large animal theriogenology*. (pp. 1061). Philadelphia, Pennsylvania, USA: W.B. Saunders Company.
- Barth, A. D. y Waldner, C. L. (2002). "Factors affecting breeding soundness classification of beef bulls examined at the Western College of Veterinary Medicine". *Can Vet J* 43 (4), pp. 274-84.
- Garner, D. L. (1991). "Artificial Insemination". En *Reproduction in Domestic Animals*. (pp. 657). USA: Academic Press, inc.
- Palmer, C. W., Amundson, S. D., Brito, L. F., Waldner, C. L. y Barth, A. D. (2004). "Use of oxytocin and cloprostenol to facilitate semen collection by electroejaculation or transrectal massage in bulls". *Anim Reprod Sci* 80 (3-4), pp. 213-23.
- Palmer, C. W., Brito, L. F., Arteaga, A. A., Soderquist, L., Persson, Y. y Barth, A. D. (2005). "Comparison of electroejaculation and transrectal massage for semen collection in range and yearling feedlot beef bulls". *Anim Reprod Sci* 87 (1-2), pp. 25-31.
- Rutter, B. y Russo, A. F. (2006). *Bases para la Evaluación de la Aptitud Reproductiva del Toro*. Buenos Aires: Agro Vet.
- Tríbulo, H. E., Alonso, N., Bó, G., Brogliatti, G. M., Caccia, M. y Carcedo, J. (2011). *Capacidad Reproductiva del Toro*. IRAC-Instituto de Reproducción Animal Córdoba.



Foto1: Electroeyaculador automático/manual con sonda de electrodos longitudinales ventrales de bovinos.



Foto 2. Vagina Artificial modelo danés.



Foto 3.: Material del laboratorio preparado para la evaluación de la muestra seminal. Microscopio óptico, baño térmico y platina térmica de microscopio..



Foto 4. Frotis de coloración vital de Eosina/Nigrosina. Se puede observar la diferencia entre los espermatozoides rosados (muertos) y los translúcidos (vivos). Presencia de alto porcentaje de anomalías espermáticas de cola.

CAPÍTULO 46

Evaluación de la aptitud reproductiva de la hembra bovina

*Maria Jaureguiberry, Ana Lorena Migliorisi, Maria Verano
Gomez, Walter Gaston Aldabe*

La evaluación de la aptitud reproductiva (EAR) consta de una serie de pasos que realiza el veterinario con el objeto de obtener información del animal y así definir un diagnóstico y tratamiento. Esta evaluación es de suma importancia ya que permite mejorar el rendimiento reproductivo del animal/rodeo. ¿Para que realizamos la EAR de la hembra bovina?

- Examen pre servicio en vaquillonas
- Alta post parto
- Alta en programas de inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) y transferencia de embriones (TE)
- Diagnóstico de anestro/ciclicidad
- Determinación de la etapas del ciclo estral
- Diagnóstico de preñez/vacuidad
- Estimar la edad gestacional
- Diagnóstico de patologías del aparato reproductivo

Pasos de la EAR

Reseña

Indica las características que definen al animal. Esta incluye:

Datos del propietario/establecimiento. Nombre, dirección, teléfono, mail.

Identificación. Es fundamental para poder llevar un seguimiento del animal. Los métodos más comunes de identificación son: tatuaje y marca a fuego como formas de identificación permanente, y caravanas o collares como forma de identificación temporaria. La identificación con tiza o pintura es de corta duración.

Raza. Hay características que difieren entre razas. El conocimiento de estas diferencias ayuda a explicar las diferencias de manejo y respuesta a los tratamientos hormonales asociados a la inseminación artificial (IA), superovulación y la producción de embriones *in vivo* e *in vitro* entre razas(Sartori y col. 2013).

Edad. Se determina por la fecha de nacimiento o por cronología dentaria. El tamaño y desarrollo de los órganos del aparato reproductor varían con la edad, el útero (cuello, cuerpo y cuernos) de una vaca adulta vacía es mayor que el de una vaquillona, por lo tanto lo que puede ser normal en una categoría puede no serlo en otra (Morrow 1986).Por otro lado el manejo puede variar según la categoría (vaquillonas, vacas)por lo que debemos tenerlo en cuenta al momento de tomar una decisión.

Anamnesis

Consiste en la recopilación de información a través de preguntas realizadas al propietario. Las preguntas apuntarán a obtener información sobre el rodeo en general y sobre el individuo en particular. A su vez, las mismas estarán relacionadas al pasado y al presente. Esta información ayudará al médico veterinario en el momento de realizar un diagnóstico y tratamiento. A continuación se mencionarán algunos de los datos importantes a tener en cuenta al momento de realizar la anamnesis:

Datos del rodeo:

Tipo de producción y tamaño del rodeo.

Manejo general del rodeo. Este punto pretende incluir información sobre el manejo nutricional, plan sanitario, rutinas de trabajo, calificación del personal (especialmente del personal encargado de la detección de celo, inseminaciones y cuidados de la vaca en transición)

Manejo reproductivo. En el caso de rodeos de leche es importante conocer el manejo de la vaca seca, manejo durante el parto y postparto, alta puerperal, diagnóstico y tratamiento de enfermedades del postparto (metritis, endometritis, hipocalcemia, cetosis, acidosis, laminitis, desplazamiento de abomaso, edema de ubre, anestro, síndrome de la vaca gorda) método de detección de celo, protocolos de sincronización, servicio natural o inseminación artificial. En el caso de los rodeos de carne es importante saber la duración del servicio, el tipo de servicio (natural o IA), el porcentaje de toros utilizados durante el servicio.

Datos productivos. En el caso de rodeos de leche los datos se referirán a días en lactancia, producción de leche por vaca en ordeño por día, carga animal, relación vaca total/vaca en ordeño, producción de leche acumulada a los 150, 305 y 365 días de lactancia y leche total acumulada en la lactancia. En el caso de rodeos de carne los datos se referirán a kg de carne por hectárea, carga animal, porcentaje de destete.

Datos reproductivos. En el caso de rodeos de leche los datos se referirán a tasa de preñez acumulada a los 100 días de lactancia, Intervalo parto-1º servicio, intervalo parto-concepción, porcentaje de preñez, tasa de preñez, tasa de concepción, tasa de detección de celo, número de servicios por preñez, porcentaje de vacas vacías a los 200 dpp, porcentaje de refugo por causas reproductivas, porcentaje de abortos (Piccardi 2014). En el caso de rodeos de carne los datos se referirán a porcentaje de preñez, porcentaje de parición, porcentaje de abortos.

Datos del animal:

Origen. Es importante conocer si los animales son comprados o nacidos en el mismo establecimiento. En el caso de que sean comprados tener en cuenta el origen.

Parto. Es importante registrar, la fecha, el tipo de parto (normal, con ayuda, o distócico), si el mismo fue asistido y si tuvo retención de placenta. Los acontecimientos que ocurren en relación al parto están vinculados con la fertilidad del animal en el próximo servicio (Walsh y col. 2011). Es importante tener en cuenta que los problemas de fertilidad tienden a incrementarse con los sucesivos partos (Jackson y Cockcroft 2008)

Puerperio. Considerar si el mismo fue normal o no, ya que también condiciona la fertilidad del próximo servicio. Estudios han demostrado que los partos distócicos, el nacimiento de mellizos y la retención de placenta son factores de riesgo pre disponentes de las infecciones uterinas y estas se relacionan con una disminución de la eficiencia reproductiva del animal (Drillich y col. 2006; LeBlanc 2008; Sheldon y col. 2008).

Celos y servicios. Es importante tener registros de la fecha de los celos y servicios. Normalmente, en vacas de tambo, el primer celo ocurre a los 30-40 días post parto, el retraso en la ocurrencia del mismo se relaciona con una disminución de la fertilidad (Giuliodori y col. 2011). Así mismo la irregularidad entre los celos puede deberse a alguna afección como por ejemplo quistes ováricos. En el caso de los servicios, intervalos mayores a 24 días pueden indicarnos muertes embrionarias o problemas de manejo como mala detección de celo (Morrow 1986).

Enfermedades en general. Afecciones como cetosis, acidosis, mastitis, problemas podales, balance energético negativo profundo, etc, tienen un impacto negativo en la fertilidad por lo tanto es importante tenerlas en cuenta(Ribeiro y col. 2013).

Tratamientos. En el caso que se haya realizado un tratamiento es importante conocer que droga se utilizó, la dosis y en qué momento.

Examen clínico general

Aspecto general. Observar la actitud del animal, las características del pelo, los garrones y la cola buscando restos de descargas vaginales ya que podría ser indicativo de infecciones uterinas. También observar los miembros y los ojos del animal. Está demostrado que los problemas podales disminuyen la eficiencia reproductiva e incrementan los porcentajes de rechazo y muerte en el ganado lechero (Bicalho y col. 2007).

*Condición corporal (CC).*La evaluación de la CC es una herramienta útil que permite medir de manera subjetiva los depósitos de grasa corporales o reservas de energía del animal. La CC puede expresarse en una escala de 1 a 5 con puntos intermedios de 0.25 (Ferguson y col. 1994) o directamente en una escala de 1 a 9. En rodeos de leche, las vacas del secado al parto no deberían cambiar de CC(utilizando la escala que va de 1 a 5, CC: 3.0-3.5); del parto al pico de lactancia no deberían cambiar en más de un punto de CC (CC: 2.0-2.5); y del pico de lactancia al secado debería recuperar la CC (CC: 3.0-3.5). En rodeos de carne generalmente se utiliza la escala que va de 1 a 9, CC de 1 a 4 corresponde a una vaca flaca, CC de 5 a 7 es óptima y CC de 8 a 9 corresponde a una vaca gorda(Wagner y col. 1988).

Frecuencia cardíaca. 50-70 latidos/min.

Frecuencia respiratoria. 15-35 inspiraciones/min. Recordar que durante el parto la misma se eleva considerablemente (Grünert y col. 1990).

Temperatura. 38.0-39.2°C. Recordar que inmediatamente antes del parto la temperatura corporal desciende normalmente 1 a 2 °C(Grünert y col. 1990).

Movimientos ruminales. 1-2 movimientos/min.

Mucosas aparentes. Normalmente se ven rosadas y brillantes.

Ganglios. Mandibulares, pre escapulares (se ubican craneodorsal de la articulación del hombro), subilíacos o prefemorales e inguinales superficial o mamarios (Rosenberger 1981).

Examen clínico particular

Externo

Vulva. Debe examinarse el tamaño, posición y coloración. Los labios vulvares deberían tener tamaño similar uno respecto al otro y no debería haber espacio visible entre ellos (Jackson y Cockcroft 2008). La posición normal de la vulva es vertical, salvo días previos al parto que puede adquirir una posición oblicua (Rosenberger 1981). Los labios vulvares pequeños pueden observarse en

animales con hipoplasia gonadal. Por el contrario, animales con labios vulvares grandes pueden observarse durante el celo, previo al parto, y en procesos inflamatorios (Rosenberger 1981).

Ubre. En el período preparto se observa un crecimiento de la glándula mamaria (en vaquillonas comienza a observarse antes que en vacas)

Interno (rectal y vaginal)

Examen Vaginal

Normalmente se realiza durante el alta post parto para el diagnóstico de enfermedades uterinas. El examen vaginal puede realizarse por:

Vaginoscopía. Esta técnica requiere de un vaginoscopio y una fuente de luz (por ejemplo, linterna puntiforme). El vaginoscopio es una estructura tubular de acero inoxidable o acrílico, cuyo diámetro y largo dependerá de la categoría del animal (vaca, vaquillona). Antes de comenzar con la técnica debemos lubricar la parte anterior del vaginoscopio para evitar lesiones o molestias en el animal. Una vez lubricado se introduce suavemente por la vagina realizando movimientos giratorios. Permite observar las características del cérvix (color de la mucosa, apertura), la vagina (color de la mucosa, presencia de lesiones, cicatrices, pólipos) y su contenido. Es una técnica muy buena, aunque el instrumental debe desinfectarse entre usos, o bien contarse con un vaginoscopio por animal a examinar, lo cual reduce la practicidad.

Metrichack. Es un dispositivo de acero inoxidable que tiene en uno de sus extremos una copa de goma con la que se recolecta el material a evaluar. Una vez desinfectado, se lo introduce en la vagina hasta contactar la copa con la zona pericervical, se realizan movimientos suaves hacia craneal y caudal, y se retira para evaluar el material colectado. Es una técnica

rápida y práctica pero se obtiene menos información que por vaginoscopía ya que esta técnica no permite diferenciar el origen de la descarga.

Recuperación de flujo vaginal (flujo). Con un guante de tacto nuevo y lubricado se introduce la mano en forma de cono suavemente en la vagina. El material se obtiene de la porción craneal de la misma. La ventaja de la técnica es que es económica, rápida y nos provee de información adicional al poder palpar y diagnosticar, por ejemplo, presencia de fibrosis o laceraciones en la vagina. Se han realizado estudios en los que demuestran que esta técnica no causa contaminación bacteriana o retraso en la involución uterina (Sheldon y col. 2002). De todas formas, al igual que con el Metrichcek, el operador debe considerar los posibles falsos positivos que se pueden dar por vaginitis o cervicitis ya que esta técnica no nos permite diferenciar el origen de la descarga.

Recordar que previamente a realizar cualquiera de las tres técnicas debemos lavar muy bien la región perineal y vulva.

Examen Rectal

Palpación rectal (se describirá más adelante)

Examen sanitario

Brucelosis. Para el control a nivel nacional se utilizan las siguientes pruebas serológicas: Prueba de aglutinación en placa (BPA) utilizada como prueba tamiz; pruebas de seroaglutinación lenta en tubo, Wright y 2-Mercaptoetanol, utilizadas como pruebas confirmatorias; y por último, prueba de anillo en leche (PAL) utilizada como vigilancia epidemiológica. Las muestras que se remiten al laboratorio pueden ser sangre entera o suero refrigerado/congelado para realizar BPA, Wright y 2-Mercaptoetanol, y leche para realizar PAL (Nicola y Elena 2009)

Tuberculosis. Para su diagnóstico se utiliza la prueba de la tuberculina, que consiste en medir la reacción inmunitaria tras la inyección intradérmica de una pequeña cantidad de antígeno (Torres y col.).

Examen complementario

Ultrasonografía (se describirá en el otro capítulo)

Bacteriología del flujo vaginal

Citología endometria: Esta técnica es utilizada principalmente para el diagnóstico de endometritis subclínica, aunque también, con pequeñas modificaciones, permite obtener

muestras de contenido uterino por ejemplo, para aislamiento bacteriano. La técnica se basa en la obtención de células endometriales mediante un cepillado de la mucosa endometrial. Para la obtención de las muestras se utiliza una pistola de acero inoxidable a la que se le adosa en su extremo anterior un cepillo estéril (comúnmente usados en ginecología humana) y mediante una vaina plástica de inseminación se cubre todo el dispositivo. Se procede a la toma de muestra por una maniobra similar a la utilizada en IA. Pasado el cérvix se expone el cepillito al endometrio y se lo hace rotar unas 4 veces. Antes de retirar la pistola el cepillito será retraído para que quede protegido nuevamente por la vaina plástica de inseminación. Para realizar la citología se hace rotar el cepillo sobre un portaobjeto nuevo y rotulado, y se lo fija con un fijador a base de alcohol. Por último, las muestras se tiñen con una tinción rápida (por ejemplo, Tinción 15[®], Biopur Diagnostic). El conteo celular se realiza a 40 aumentos, se cuentan 200 células y de ellas se obtiene el porcentaje de neutrófilos. El punto de corte para el diagnóstico de ES es de 5% (Madoz y col. 2013).

Biopsia endometrial: Esta técnica no se utiliza de rutina en la hembra bovina, ha sido utilizada principalmente en reproducción equina debido a que mediante ésta, se logra pronosticar la habilidad de la yegua para concebir y para llevar a término una nueva gestación (Kenney 1978). La muestra se toma con una pinza para biopsia la cual posee en su extremo anterior una especie de mandíbula con filo en sus bordes. Una vez enhebrado el cérvix, se hace contactar la pinza con la pared uterina y se toma una porción de tejido. Posteriormente se retira la pinza de biopsia del animal, y se coloca la muestra en tubos tipo Eppendorf (1,5 ml) con solución formolada tamponada al 10% hasta su procesamiento histológico. En el laboratorio, las muestras son deshidratadas, incluidas en parafina, cortadas con micrótopo y teñidas con hematoxilina y eosina para la obtención de los cortes correspondientes de útero. Una vez terminado su procesamiento se observan en un microscopio óptico (Madoz y col. 2014).

Evaluación de la hembra bovina por palpación rectal

La palpación rectal es un método físico utilizado para la exploración del aparato reproductor de la hembra bovina con el cual podemos determinar estados fisiológicos (funcionalidad

ovárica, momento del ciclo estral, gestación o vacuidad), o patológicos (piómetras, quistes ováricos, aplasia segmentaria, y otras).

Previo a realizar el examen rectal es necesario tener en cuenta:

Vestimenta: se recomienda el uso de un overall, ambo o delantal, así como guantes de tacto rectal. La sujeción del guante al brazo puede realizarse con una tijera hemostática, la cual debe pinzar el guante y la ropa a la altura del brazo, o un disco de goma con un orificio por el cual se coloca el brazo; también puede utilizarse una banda de goma. La mano que no se utiliza para palpar puede protegerse, con un guante de látex (cuando los animales están limpios) o un guante grueso (en el caso de los animales cuyas colas tengan abrojos). Las botas de gomas completan la vestimenta. El operador no debe poseer reloj, pulseras o anillos en la mano usada para la palpación y debe asegurarse de tener las uñas cortas para evitar lesionar la mucosa del recto.

Sujeción del animal: las maniobras se deben llevar a cabo en una manga y es preciso que el animal esté sujeto por medio un cepo. De ser necesario, se utilizará el apretavacío para una mejor contención. Debe tenerse en cuenta que la sujeción del animal es fundamental para evitar todo tipo de accidentes, siendo el de mayor riesgo cuando el animal realiza movimientos laterales bruscos o se cae y el brazo está introducido por encima del codo.

Lubricación: el uso de lubricantes es indispensable para evitar lesiones de la mucosa rectal y, además, facilita la entrada de la mano al recto. Comúnmente se utiliza gel (para ultrasonografía) o vaselina. La lubricación se realiza sobre la mano, principalmente sobre la cara dorsal de la misma. Como segunda elección puede utilizarse agua con jabón neutro.

Importante: Una vez introducida la mano NO retirarla por completo del recto ya que por diferencia de presiones se introduce aire en el recto provocando su distensión, la cual impide una buena palpación. Para causar la evacuación del aire de la ampolla rectal debe tomarse un pliegue de mucosa y dirigirlo, con movimientos suaves, hacia el esfínter anal. La misma precaución debe tomarse si otro operador va a palpar. Para ello, se debe quitar el brazo dejando la mano en el esfínter anal y retirarla luego de que el otro operador introdujo la suya.

Revisión anatómica

Vulva: La vulva es la porción externa del aparato genital. Está ubicada en la región perineal en ventral al ano. Está formada por los labios vulvares que se unen dando origen a la comisura dorsal y ventral. En la comisura ventral se encuentra el clítoris (König y Liebich 2005). La vulva se continúa internamente con el vestíbulo vaginal, que es la vía común al tracto urinario y genital. En el vestíbulo vaginal desembocan el orificio uretral externo, que se encuentra a unos 10 cm de la comisura ventral, y las glándulas vestibulares. En relación a éste último se encuentra el divertículo suburetral. (Getty y Grossman 2002).

Vagina: La vagina es el órgano copulatorio de la vaca, mide unos 25 a 30 cm de largo y se extiende desde el cérvix hasta el vestíbulo vaginal. La división entre vagina y vestíbulo vaginal está determinada por el orificio uretral externo. En relación al cérvix la vagina forma un fondo de saco denominado fornix vaginal.

El toro deposita el semen en el fondo de la vagina.

Útero: El útero de la hembra bovina consta de dos cuernos, un cuerpo y un cérvix. El útero y la porción anterior de la vagina están suspendidos por el perimetrio (ligamento ancho), el cual se fija en la superficie cóncava o curvatura menor de los cuernos y lateralmente al cuerpo y cérvix. De esta unión, los ligamentos se extienden lateral y dorsalmente para unir la pared del cuerpo al cuadrante dorsolateral. Los cuernos miden de 35 a 40 cm y su diámetro es de 2.5 a 3 cm, son tubulares y se curvan ventral, craneal y lateralmente para después hacerse caudales y dorsales. Las partes caudales de los cuernos (aproximadamente unos 10 cm) están unidas por tejido conectivo y muscular y tienen una cubierta peritoneal común, ligamento intercornual dorsal y ventral. A la palpación rectal esta porción caudal de los cuernos se confunde con el cuerpo sobreestimando la longitud de este último. El cuerpo es pequeño, tiene unos 3 a 4 cm de largo. El cérvix mide unos 10 cm de largo y su pared tiene un grosor de 3 cm (Getty y Grossman 2002). La forma del cérvix es semicónica y generalmente no varía con cambios de volumen del útero. A la palpación podemos notar la presencia de 3 a 5 anillos cervicales.

Oviductos o trompas uterinas: Los oviductos son estructuras pares, miden unos 20-25 cm de largo y están suspendidos por el mesosalpinx (ligamento ancho). Las partes que lo componen son: infundíbulo, ampolla e istmo. El infundíbulo tiene forma de embudo, y es el encargado de captar el óvulo luego de la ovulación. La ampolla, es un segmento ligeramente dilatado, y es donde se produce la fecundación. Posteriormente el óvulo/embrión continúa por el istmo para llegar al útero. En el caso de la especie bovina la transición entre el istmo y cuerno uterino es gradual (König y Liebich 2005). Normalmente, el oviducto solo es palpable cuando está afectado por un proceso inflamatorio (Zemjanis 1977).

Ovarios: Los ovarios miden aproximadamente entre 3.5 a 4 cm de longitud, 2.5 cm de ancho y tienen alrededor de 1.5 cm de grosor en su porción mayor. Poseen una forma oval. Usualmente están situados cerca de la mitad del borde lateral de la entrada pelviana. Están suspendidos por el mesovario a unos 5 cm del extremo ovárico del cuerno uterino.

Vasos y nervios: La principal arteria del útero es la arteria uterina media, y la acompañan la arteria uterina craneal y caudal. La arteria uterina media es rama de la arteria umbilical y esta a su vez es una rama colateral de la iliaca interna. La arteria uterina craneal es una rama de la

arteria ovárica que a su vez es una rama de la arteria iliaca externa. La arteria uterina caudal es una rama de la arteria urogenital que a su vez es rama de la arteria iliaca interna.

Los vasos linfáticos van a los nódulos linfáticos iliacos medios principalmente, y también a los lumbares aórticos.

El ovario recibe fibras parasimpáticas del nervio vago y de la parte sacra del parasimpático. Las fibras simpáticas provienen del plexo intermesentérico o mesentérico caudal. El resto del aparato genital está innervado por fibras del plexo pélvico.

Técnica de exploración transrectal

La introducción de la mano se realiza por el esfínter anal, en forma de cuña. Al contactar con la ampolla rectal, se produce el reflejo de defecación provocando peristaltismo. Para realizar una buena palpación es mejor eliminarla materia fecal. Para esto se coloca la mano en forma de cuchara y se lleva la materia fecal hacia caudal sin sacar la mano del recto. Luego se continúa introduciendo el brazo en forma suave, más allá de las estructuras a palpar. Durante la presencia de ondas peristálticas NO se debe continuar con el examen, ya que se puede lesionar la mucosa rectal.

Para facilitar el examen transrectal existen **puntos de referencia** que nos ayudan a orientarnos e identificar los órganos que queremos evaluar. Los puntos de referencia fácilmente reconocibles son: el piso de la pelvis, el borde craneal del pubis y el íleon.

Para la exploración genital lo primero que debemos localizar es el *cérvix o cuello uterino*. Para ello colocamos la mano sobre el piso de la pelvis cerca del borde craneal del pubis. Con los dedos levemente encorvados deslizamos la mano hacia uno de los lados hasta la pared de la pelvis y posteriormente realizamos la misma maniobra hacia el lado contrario. El cérvix se reconoce como una estructura firme y cilíndrica, generalmente en la línea media del piso de la pelvis. Durante la exploración del mismo se evalúa: tamaño, forma y posición. Estas características son importantes ya que nos brindan información que nos ayuda a aproximarnos al diagnóstico ya que por ejemplo, el tamaño del cérvix varía con la edad, durante la gestación y el parto, en procesos inflamatorios/infecciosos o en enfermedades congénitas como freemartin o enfermedad de las terneras blancas. Las deformaciones o distorsiones del cérvix o del orificio cervical externo, generalmente se dan en vacas viejas producto de partos distócicos o cuando se realiza una mala técnica de inseminación artificial. Suposición y movilidad dependen del peso del útero. El aumento de peso del útero hace tracción del cérvix sobre el borde del pubis y lo coloca en una posición abdominal y fija impidiendo la libertad de movimiento (cuadro 1).

Cuadro 1 Condiciones fisiológicas y patológicas relacionadas con la posición y movilidad del cérvix (Zemjanis 1977)

Cérvix pélvico y móvil	Cérvix abdominal y fijo
Normal y vacío Preñez no mayor a los 60-70 días Puerperio clínico completo (>21dpp) Acumulación de líquidos en útero no mayor a los 2 litros	Preñez mayor a los 70 días. Puerperio clínico incompleto (<21 dpp) Acumulación de líquidos en útero mayor a los 2 litros Momificación y maceración fetal Adherencias extensas.

En los casos en los que encontremos el cérvix móvil, continuamos realizando la maniobra de retracción para evaluar el resto del órgano y los ovarios.

Método de exploración directo: se toma el cérvix y se lo tracciona hacia caudal. Se dirigen los dedos índice y mayor hasta localizar la bifurcación de los cuernos y se sujeta el útero por el ligamento intercornual ventral. Posteriormente se toma un cuerno y se realiza la palpación en todo su largo, reconociendo la presencia de líquidos, grosor de la pared, diámetro, etc. Luego se precede a realizar la misma maniobra para la exploración del cuerno contralateral. Este método es fácil de realizar en hembras de razas carniceras y en hembras primíparas.

Método de exploración indirecto: una vez localizado y traccionado el cérvix hacia caudal, se sostiene el cuerpo uterino colocando el pulgar por debajo. Se gira la mano hacia fuera, y con los dedos encorvados se toma el ligamento ancho del útero. Una vez tomado el ligamento ancho, se levanta y dirige hacia la línea media y el cuerno se sostiene en la palma. El cuerno se tira hacia atrás y los dedos se deslizan hasta la bifurcación cornual donde se vamos a palpar el ligamento intercornual ventral. Este método se recomienda en hembras de raza lecheras (Holando Argentino) y en hembras múltiparas, en las que los úteros tienen cierto peso y dificulta la exploración directa.

Utilizando uno de los dos métodos de exploración antes mencionados, podremos abarcar todo el útero y ovarios, lo cual es muy importante para realizar un buen diagnóstico.

Útero no gestante

El útero no gestante puede presentar cambios que corresponden a distintas situaciones tanto fisiológicas como patológicas. Dentro de los cambios fisiológicos están aquellos que se relacionan al ciclo estral normal de la vaca. Durante la etapa de proestro, donde los estrógenos

comienzan a aumentar, se produce un aumento gradual del tono uterino que alcanza su máxima expresión durante la etapa del estro. El útero se palpa más turgente y los cuernos se curvan sobre si mismo adquiriendo la apariencia de un manubrio de bicicleta de carrera. Durante la etapa de diestro, donde la progesterona está alta, el útero pierde tono presentándose más flácido. Otros cambios fisiológicos que podemos encontrar en un útero no gestante se dan durante la involución uterina. La involución uterina corresponde al puerperio clínico, el cual dura aproximadamente 21 días. Un punto importante a tener en cuenta es que el cérvix tiene una involución más lenta que el resto del útero (a los 15 dpp su diámetro normalmente es mayor que el de los cuernos, (LeBlanc 2008) por lo que encontrar un útero con estas características durante la evaluación ginecológica para diagnóstico de gestación podría ser indicativo de aborto. Por otro lado, dentro de los cambios patológicos que podemos encontrar están los que se relacionan a afecciones uterinas como metritis, endometritis y piómetra. En estos casos podemos encontrar la pared uterina engrosada, aumento de tamaño uterino, colecta uterina. Otros cambios pueden aparecer por enfermedades congénitas como freemartinismo, enfermedad de las terneras blancas, útero unicorneo.

Una vez evaluado el útero se debe continuar con el examen de los ovarios. La palpación de los ovarios se realiza tomando el ligamento utero-ovárico y deslizando los dedos por los lados, hasta localizarlos. El ovario se colocará entre el dedo índice y mayor y se palpará con el pulgar. Toda estructura \geq a 0,5 cm debiera ser palpable. Los folículos se palpan como estructuras redondeadas, lisas y tensas, que generalmente no deforman el ovario (Hanzen y col. 2000). Después de la ovulación, durante el metaestro, el folículo que ovuló queda como una pequeña depresión difícil de palpar (cuerpo hemorrágico), por lo que ese ovario podría aparentar no tener estructuras (Hanzen y col. 2000). El cuerpo lúteo posee una consistencia hepática y puede presentar una “corona”, que es una extensión del tejido luteal en forma de prominencia que sobresale sobre la superficie. También llega a alterar la forma del ovario, ya que su localización es principalmente intraovárica.

Los oviductos normalmente no se palpan, salvo en condiciones patológicas. La exploración de la bolsa ovárica se realiza sujetando al ovario por el ligamento útero-ovárico y deslizando los dedos entre la superficie ovárica y la bolsa. Posteriormente se separan los dedos para descartar la presencia de adherencias.

Útero gestante

Diagnóstico de gestación: los signos de gestación se dividen en primarios y secundarios.

Los signos primarios, son específicos de gestación y con la presencia de solo uno de ellos es posible diagnosticarla.

Los signos secundarios, no son específicos de gestación, ya que pueden encontrarse en otros procesos fisiológicos o patológicos.

Por lo tanto “el diagnóstico de gestación se basa en la detección de uno o más de los signos primarios”.

Signos primarios

Vesícula amniótica: El amnios que contiene al embrión y líquido amniótico forman la vesícula amniótica. Ésta se palpa como una estructura turgente dentro del útero (en forma de bolita). La turgencia de la vesícula se pierde gradualmente a medida que avanza la gestación, a los 45-50 días el límite exterior de la vesícula es menos preciso (Zemjanis 1977). El diagnóstico de gestación por la palpación de la vesícula amniótica se puede realizar a partir del día 34 de gestación sin riesgo de afectar la viabilidad del embrión (Romano y Fahning 2013).

Signo del *pellizco positivo* o doble *pellizco*: es la determinación de la presencia de la membrana corioalantoidea. Al realizar la exploración del útero, debe realizarse la siguiente maniobra: con el dedo pulgar e índice se toma la pared uterina y se hace deslizar entre los dedos. En caso de que exista el doble pellizco se percibirá que, aún con la pared uterina entre los dedos, se desliza otra membrana y luego la pared del útero. La primera membrana que se desliza corresponde a la corioalantoidea. Este signo puede comenzar a palparse a partir de los 35 días de preñez, sin riesgos de afectar la viabilidad del embrión (Romano y col. 2007), hasta el final de la gestación. Se utiliza principalmente alrededor del día 60, ya que durante dicho período se dificulta la vesícula amniótica pierde su turgencia, sus bordes no son tan definidos y los placentomas aún no son palpables

Placentomas: se reconocen como formaciones bien limitadas que se palpan a través de la pared del útero. Los placentomas están conformados por las carúnculas maternas y los cotiledones fetales. El tamaño de los placentomas aumenta junto con el desarrollo de la gestación y además, varían en tamaño dependiendo de su posición en el útero, ya que los centrales son de mayor tamaño que los anteriores y los posteriores. Estos últimos son los que se toman como referencia para determinar edad gestacional, ya que son los únicos palpables durante toda la gestación. Son apreciables a partir de los 70 días de gestación. Durante el período en el cual el *conceptus* se encuentra descendido, pueden palparse apoyando la palma sobre el borde pélvico y deslizando la mano lateralmente.

Feto: A partir de la pérdida de la turgencia de la vesícula amniótica comienza a palparse el feto. Entre los días 70 y 120 aproximadamente es posible realizar la maniobra de peloteo. En dicha maniobra se da una palmada al útero y se percibe el rebote del feto en la palma de la mano. A partir del 5º mes de gestación el feto se ubica en el piso del abdomen, momento en el cual es difícil de palpar (sólo se toman como referencia los placentomas). Alrededor del 5º ½ o 6º mes comienza la etapa de ascenso, luego de la cual se llegan a distinguir las partes fetales.

Signos secundarios

- Ausencia de celo.
- Aumento de tamaño del útero.
- Asimetría de cuernos uterinos.
- Fluctuación.
- Aumento de la progesterona ($\geq 1\text{ng/ml}$)
- Inmovilidad del cérvix.
- Aumento del diámetro de arteria uterina
- Presencia de frémito de arterias uterina.
- Presencia de cuerpo lúteo.

Tabla 1. Edad Gestacional (Bartolome ; Zemjanis 1977)

Edad Gestacional	Cuerno Uterino (cm)	Fluido (ml)	Vesícula Amniótica (cm)	Feto Tamaño (cm)	Placentomas Diametro (cm)	Arteria Uterina (cm)	Características del feto y placenta
30 días	2-4	30-60	1	0,8-1			Esbozos de cabeza y miembros. Placenta aún no implantada.
40 días	3-6	75-100	2,5-3	1,75-2,5			
50 días	5-7	90-200	3,5-5	3,5-5,5			
60 días	6-9	200-450	6-7,5	6-8 (Laucha)			Esbozos de pezuñas y escroto, paladar y esternón cerrados, placenta implantada, cotiledones del tamaño de lentejas.
70 días	7-10	350-650		7-10	0,5-0,75		
80 días	9-12	500-800		8-13	0,5-1		
90 días	10-13	750-1400		13-17 (Rata)	1-1,5	0,3-0,5	Pelos en labios, mandíbula y orbitas, escroto visible.

120 días	12,5-18	2000-3500		22-32 (Gato chico)	1,5-2,5	0,5-0,8	Pelos finos en cejas, pezuñas desarrolladas, placas epiteliales amarillas en el amnios, esbozos de cuernos.
150 días	18-23	4000-5000		30-45 (Gato grande)	2,5-4	0,6-1,0	Pelos cejas y labios, testículos en el escroto, pezones en desarrollo.
180 días		4000-7500		40-60 (Perro chico)	4-5	0,9-1,25	Pelos dentro de la orejas, alrededor de cuernos, punta de cola y morro.
210 días		6300-10000		55-75	5-7,5	1,25-1,5	Pelo en los metatarsos, metacarpos, falanges y pocos en el lomo, pelos largos en la punta de la cola.
240 días		8000-12000		60-85	6-9	1,25-1,7	Pelo corto y fino en todo el cuerpo, dientes incisivos aún no visibles.
270 días		12000-20000		70-100	8-12	1,5-1,9	Pelaje completo y largo, feto grande y dientes incisivos presentes.

Evaluación del desarrollo reproductivo por palpación rectal

El sistema de evaluación por palpación rectal del aparato reproductor en vaquillonas fue desarrollado por *Anderson, LeFever y Odde* (Rosenkrans y Hardin 2003). Este sistema de evaluación se utiliza para seleccionar las hembras de reposición que integrarán el rodeo general, ya que se sabe que las vaquillonas que entran al servicio habiendo ciclado tres veces tienen tasas de preñez superiores que aquellas que ciclaron solo una vez. Este sistema utiliza una escala de calificación que va de 1 a 5, siendo 1 infantil y 5 vaquillonas ciclando con cuerpo lúteo palpable. Esta calificación mostró ser de media heredabilidad (0.321) por lo que las vaquillonas 1 y probablemente las 2 deberían ser rechazadas.

Grado de desarrollo reproductivo (GDR)

GDR1: Tracto reproductivo inmaduro. El útero se encuentra sin tono y no hay estructuras ováricas palpables. Se considera prepuberal.

GDR2: No están ciclando. Los órganos reproductivos tienen un mejor desarrollo que las de GDR1. Posiblemente la mayoría comience a ciclar en unos 45 días. De acuerdo a la decisión del veterinario, en concordancia con el productor, pueden ser rechazadas. Se considera prepuberal

GDR3: Son aquellas que están cerca de la pubertad pero que no han ciclado todavía. Se considera prepuberal

GDR4: Son aquellas que han ciclado por lo menos una vez, basado en la presencia de cuerpo lúteo y en el desarrollo del útero y de los cuernos uterinos. Se considera púber

GDR5: Se considera púber (Rosenkrans y Hardin 2003)

Bibliografía

- Bartolome, J. Palpación rectal y ecografía del tracto genital en bovinos. Universidad Nacional de La Pampa: 19.
- Bicalho, R. C., F. Vokey, H. N. Erb y C. L. Guard (2007). "Visual locomotion scoring in the first seventy days in milk: impact on pregnancy and survival". *J Dairy Sci* 90 (10), pp. 4586-4591.
- Drillich, M., M. Mahlstedt, U. Reichert, B. A. Tenhagen y W. Heuwieser (2006). "Strategies to improve the therapy of retained fetal membranes in dairy cows". *J Dairy Sci* 89 (2), pp. 627-635.
- Ferguson, J. D., D. T. Galligan y N. Thomsen (1994). "Principal descriptors of body condition score in Holstein cows". *Journal of Dairy Science* 77 (9), pp. 2695-2703.
- Getty, R. y J. D. Grossman (2002). *Anatomía de los animales domésticos*. (Elsevier Masson).
- Giuliodori, M., J. Rodriguez, R. Magnasco, I. Lacau, C. Risco y R. De la Sota (2011). "Puerperal metritis in dairy cows: risk factors, efficacy of ceftiofur therapy and reproductive efficiency". *Clinical Theriogenology* 3 pp. 383.
- Grünert, E., J. J. Ebert y J. E. B. Ostrowski (1990). *Obstetricia del bovino*. (Hemisferio Sur).
- Hanzen, C., M. Pieterse, O. Scenczi y M. Drost (2000). "Relative accuracy of the identification of ovarian structures in the cow by ultrasonography and palpation per rectum". *Vet J* 159 (2), pp. 161-170.
- Jackson, P. y P. Cockcroft (2008). *Clinical Examination of Farm Animals*. (Wiley).
- Kenney, R. M. (1978). "Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death". *J Am Vet Med Assoc* 172 (3), pp. 241-262.
- König, H. E. y H. G. Liebich (2005). *Anatomía de los animales domésticos: texto y atlas en color*. (Médica Panamericana).
- LeBlanc, S. J. (2008). "Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: a review". *The Veterinary Journal* 176 (1), pp. 102-114.
- Madoz, L. V., M. J. Giuliodori, M. Jaureguiberry, J. Plontzke, M. Drillich y R. L. de la Sota (2013). "The relationship between endometrial cytology during estrous cycle and cutoff points for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows". *Journal of Dairy Science* 96 (7), pp. 4333-4339.
- Madoz, L. V., M. J. Giuliodori, A. L. Migliorisi, M. Jaureguiberry y R. L. de la Sota (2014). "Endometrial cytology, biopsy, and bacteriology for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows". *Journal of Dairy Science* 97 (1), pp. 195-201.
- Morrow, D. A. (1986). *Current Therapy in Theriogenology: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Reproductive Diseases in Small and Large Animals*. (Saunders).
- Nicola, A. M. y S. Elena (2009). Manual de diagnóstico serológico de la Brucelosis bovina: 95.
- Piccardi, M. B. (2014). "Indicadores de eficiencia productiva y reproductiva en rodeos lecheros". Doctor, Universidad Nacional de Córdoba.

- Ribeiro, E. S., F. S. Lima, L. F. Greco, R. S. Bisinotto, A. P. Monteiro, M. Favoreto, H. Ayres, R. S. Marsola, N. Martinez, W. W. Thatcher y J. E. Santos (2013). "Prevalence of periparturient diseases and effects on fertility of seasonally calving grazing dairy cows supplemented with concentrates". *J Dairy Sci* 96 (9), pp. 5682-5697.
- Romano, J. E. y M. L. Fahning (2013). "Effects of early pregnancy diagnosis by per rectal palpation of the amniotic sac on pregnancy loss in dairy cattle". *J Am Vet Med Assoc* 243 (10), pp. 1462-1467.
- Romano, J. E., J. A. Thompson, D. C. Kraemer, M. E. Westhusin, D. W. Forrest y M. A. Tomaszewski (2007). "Early pregnancy diagnosis by palpation per rectum: influence on embryo/fetal viability in dairy cattle". *Theriogenology* 67 (3), pp. 486-493.
- Rosenberger, G. (1981). *Exploración clínica de los bovinos*.
- Rosenkrans, K. S. y D. K. Hardin (2003). "Repeatability and accuracy of reproductive tract scoring to determine pubertal status in beef heifers". *Theriogenology* 59 (5-6), pp. 1087-1092.
- Sartori, R., P. S. Baruselli, C. M. Barros y M. R. Bastos (2013). "Las diferencias en la fisiología de la reproducción entre bos taurus y bos indicus". En IRAC. *X Simposio Internacional de Reproducción Animal*
- Sheldon, I. M., D. E. Noakes, A. N. Rycroft y H. Dobson (2002). "Effect of postpartum manual examination of the vagina on uterine bacterial contamination in cows". *Vet Rec* 151 (18), pp. 531-534.
- Sheldon, I. M., E. J. Williams, A. N. Miller, D. M. Nash y S. Herath (2008). "Uterine diseases in cattle after parturition". *Vet J* 176 (1), pp. 115-121.
- Torres, P., C. del Llano y A. Pecker "Tuberculosis bovina". SENASA [en línea]. Consultado <http://www.senasa.gov.ar/Archivos/File/File1008-5.pdf>.
- Wagner, J. J., K. S. Lusby, J. W. Oltjen, J. Rakestraw, R. P. Wettemann y L. E. Walters (1988). "Carcass composition in mature Hereford cows: estimation and effect on daily metabolizable energy requirement during winter". *J Anim Sci* 66 (3), pp. 603-612.
- Walsh, S. W., E. J. Williams y A. C. Evans (2011). "A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows". *Animal Reproduction Science* 123 (3-4), pp. 127-138.
- Zemjanis, R. (1977). *Reproduccion animal ; diagnostico y tecnicas terapeuticas*. (Limusa).

CAPITULO 47

Enfermedades del tracto reproductivo de la hembra bovina

Laura Vanina Madoz, Maria Jaureguiberry

Las afecciones reproductivas de la hembra bovina pueden afectar la manifestación y la detección del celo, la producción, transporte y fertilización del ovocito, la implantación como así también el desarrollo de la gestación. La prevención y el tratamiento de los desórdenes del tracto reproductivo son muy importantes para el mantenimiento de un intervalo rentable entre partos, lo cual significa un gran desafío para el veterinario a cargo del rodeo lechero y a la vez una oportunidad para brindar un servicio de gran valor.

A continuación se describen las afecciones más comunes del tracto reproductivo que afectan a la eficiencia reproductiva y de principal importancia clínica en las vacas de tambo.

Desórdenes de los ovarios

Los ovarios juegan un rol central en la reproducción, ya que no solo producen las gametas femeninas sino que también las hormonas responsables de la ciclicidad y el comportamiento reproductivo. Alteraciones en su normal funcionamiento pueden resultar en subfertilidad, infertilidad o en esterilidad, dependiendo de la severidad del daño.

Quistes ováricos

Definición: Un quiste ovárico es una estructura patológica que se origina de un folículo que no ovula y que continúa creciendo. El quiste persiste en el ovario por al menos 10 días y su diámetro es superior a 20 mm (Youngquist 1997). Para ser considerado como quiste activo, no debe estar acompañado por un cuerpo lúteo.

Etiopatogenia: Los quistes se forman debido a un defecto en el eje reproductivo (hipotálamo-hipófisis-ovario). Estudios realizados han demostrado que tanto los ovarios como la hipófisis, funcionan perfectamente bien en vacas quísticas por lo que el problema radicaría en el hipotálamo. En las vacas quísticas, el estradiol proveniente del ovario no induce la suficiente liberación de GnRH por parte del hipotálamo y por lo tanto no se genera el pico de LH necesario para la ovulación (Silvia y col. 2002). De esta manera, se presenta una falta casi total o parcial de LH que conduce a la formación de quistes foliculares o luteales respectivamente. Ambos tipos de quiste se cree que son parte de la misma afección y pueden convertirse y cambiar de quiste folicular a luteal (Divers y Peek 2008)

Es importante tener en cuenta que las vacas quísticas tienen predisposición a repetir la formación de quistes en sus ovarios. Esto es debido a que los folículos que se desarrollan en presencia de inusuales concentraciones de progesterona (P4), son propensos a formar quistes, mientras que aquellos que se desarrollan con concentraciones bajas normales de P4, frecuentemente ovulan. La presencia de células luteales en las paredes de los folículos quísticos, podría ser la fuente de esa concentración de P4 que inhibe la ovulación y predispone a la formación de un nuevo quiste (Silvia y col. 2002, Hatler y col. 2008).

Signos clínicos: Los quistes son una de las fallas reproductivas más importantes durante el posparto de las vacas de tambo al aumentar el intervalo parto-concepción y al aumentar los rechazos por causas reproductivas (Noakes y col. 2008). La prevalencia de quistes ováricos en vacas de tambo ronda los 6-20%, siendo más comunes en vacas de alta producción de leche (Youngquist 1997)

Los típicos signos de un quiste ovárico son la ninfomanía o el anestro. Las vacas con quistes foliculares en su mayoría presentan ninfomanía manifestando prolongados signos de estro como vulva edematosa, copiosa descarga de mucus vaginal translucido, marcada relajación de los ligamentos sacrociáticos y elevación de la cola, además muestran un temperamento más nervioso y se encuentran ávidas a montar y de ser montadas (Noakes y col. 2008). Por otro lado, los quistes luteales usualmente se presentan con un cese de la actividad cíclica normal, funcionando esta estructura como un cuerpo lúteo persistente.

Diagnóstico: Diferenciar entre un quiste folicular de un luteal por palpación transrectal no es tarea fácil. La ultrasonografía (USG) y la medición de la concentración de P4 plasmática son las mejores herramientas para diferenciarlos correctamente. (Divers y Peek 2008)

Quiste folicular: estructura fluctuante, anecoica a la USG, ≥ 20 mm de diámetro, de pared delgada, presenta poca o nula luteinización de la pared por lo que se acompaña de bajas concentraciones de P4 plasmática y altas concentraciones de Estradiol. Suele presentarse más de un quiste a la vez y pueden afectar a uno o a ambos ovarios.

Quiste luteal: estructura anecoica a la USG, de ≥ 20 mm de diámetro, de pared más gruesa y menos fluctuante que la del quiste folicular ya que contiene tejido luteal. Suelen presentarse únicos y se acompañan de concentraciones de P4 sérica más elevadas (Divers y Peek 2008, Noakes y col. 2008)

Cabe aclarar que los llamados cuerpos lúteos quísticos (también llamados cuerpos luteos cavitarios) no deben ser confundidos con los quistes luteales ya que estos son estructuras normales que no alteran la ciclicidad ni la fertilidad de la hembra. Los cuerpos lúteos quísticos, son cuerpos lúteos funcionales con una cavidad interior con fluido de entre 7 a 10 mm de diámetro (Divers y Peek 2008) Su pared es más gruesa que la de cualquier quiste ovárico.

Tratamiento: El tratamiento de elección para ambos quistes se basa en una dosis de GnRH para la liberación de LH y consecuente ovulación o la luteinización del quiste, seguido de una dosis de PGF_{2 α} siete días más tarde. Las vacas generalmente mostrarán celo 3-5 días post tratamiento cuando podrán ser inseminadas. En caso de no detectar celo, una segunda dosis de GnRH puede ser administrada dos días post PGF_{2 α} e inseminada 16 hs más tarde (protocolo OVSYNCH).

En el caso de diagnosticar un quiste luteal, se puede resolver solo con la administración de una dosis de PGF_{2 α}

Tumor de células de la granulosa

Es el tumor ovárico más común en bovinos, aunque su prevalencia es bastante baja (<0,5%). El tamaño del tumor es variable aunque puede llegar a tener grandes dimensiones (hasta 12 kg). Pueden ser completamente sólidos o presentar quistes en su estructura. Este tumor puede generar metástasis.

La signología es variable, puede presentar ninfomanía o anormalidad en la ciclicidad. El único tratamiento posible es la ovariectomía unilateral en aquellas vacas que no presenten alteraciones en sus características sexuales secundarias (Youngquist 1997).

Infecciones uterinas del postparto

Las infecciones uterinas se encuentran dentro de los principales desórdenes que afectan a las vacas de tambo durante el posparto. Afectan negativamente la fertilidad de la hembra ya que aumentan el intervalo de tiempo entre partos. Esto junto con una mayor cantidad de servicios necesarios por preñez y los costos de los tratamientos requeridos, genera importantes pérdidas económicas en los establecimientos tamberos.

Etiopatogenia: El útero normalmente está protegido de la contaminación externa por medio de la vulva, la vagina y el cérvix. Durante el parto, estas barreras mecánicas son vulnerables y es común que la mayoría de las vacas presenten contaminación bacteriana en la luz uterina durante las dos primeras semanas postparto (LeBlanc 2008). Esto no indica que las hembras vayan a desarrollar infección uterina, normalmente un alto porcentaje de las mismas tiene capacidad de autocura ya que los mecanismos de defensa uterinos pueden eliminar los contaminantes. Que esto ocurra o no depende de la respuesta inmune del animal, así como también de la especie y el número de bacterias presentes y el manejo de los animales (Sheldon y col. 2006).

Entre los factores de riesgo predisponentes a las infecciones uterinas se encuentran la retención de membranas fetales, distocias, natimortos, mellizos (Youngquist 1997, Sheldon y col. 2006) y un balance energético negativo pronunciado (Giuliodori y col. 2011).

Dentro de las bacterias que se aíslan con mayor frecuencia se encuentra la *Escherichia coli*, especialmente durante los primeros días postparto (dpp). Esta ejerce efectos negativos sobre el ovario, eje hipotálamo-hipófisis, y la salud general del animal (Sheldon y col. 2009). La *Trueperella pyogenes* es otra de las bacterias patógenas uterinas aisladas con mayor frecuencia, produce daños severos sobre el endometrio, en ocasiones actúa sinérgicamente con *Fusobacterium necrophorum* y *Prevotella sp* incrementando el daño tisular.

Metritis

Definición: La metritis es un proceso inflamatorio que abarca la totalidad de la pared uterina. Ocurre dentro de los 21 dpp aunque es más común que ocurra dentro de los primeros 10 dpp. Los signos más característicos son el aumento del tamaño del útero (más que el esperable) y las descargas uterinas, que van desde fluidos rojo amarronados, hasta descargas purulentas y viscosas, frecuentemente con olor fétido (Sheldon y col. 2009).

Los animales que la padecen pueden presentar o no signos sistémicos. En los casos que presentan signos sistémicos la enfermedad se denomina metritis puerperal o tóxica (Sheldon y col. 2006)

Signos clínicos: La metritis puede ser categorizada en 3 grados en base a los signos clínicos del animal y a su severidad.

Grado I: se da en aquellos animales que presentan un retraso en la involución uterina y descargas uterinas que varían de fluidos rojo amarronados hasta descargas purulentas viscosas. No presentan signos sistémicos de enfermedad.

Grado II: se da en aquellos animales que además presentan signos de enfermedad sistémica como disminución de la producción de leche, malestar y fiebre ($>39.5^{\circ}\text{C}$).

Grado III: además de los signos antes mencionados se suman los de toxemia. Estos son inapetencia, extremidades frías, depresión, y/o colapso. El pronóstico es desfavorable. (Sheldon y col. 2009)

Diagnóstico: Se realiza en base a la anamnesis, presencia de fiebre, examen clínico general, evaluación del útero y del flujo vaginal. La anamnesis sobre la historia reproductiva del animal, especialmente lo ocurrido en el último parto (natimortos, mellizos, distocia, retención de membranas fetales, o hipocalcemia) nos ayudan a identificar animales con riesgo de desarrollar infecciones uterinas. La metritis llega a afectar al 40% de las vacas de tambo (Sheldon y col. 2009, Giuliodori y col. 2013)

Durante el examen uterino evaluamos el proceso de involución uterina relacionando las características del mismo (tamaño) y los dpp. La evaluación de flujo vaginal tiene como objetivo determinar las características de consistencia, color y olor del mismo. Es importante saber diferenciar entre descargas normales o loquios y descargas anormales o patológicas. (Sheldon y col. 2006, LeBlanc 2008)

El examen del contenido uterino se puede realizar por USG, las descargas uterinas pueden ser evaluadas a través del flujeo, vaginoscopía o Metrichack. Estas últimas tres técnicas poseen similar sensibilidad por lo que su elección no debería afectar al diagnóstico (Pleticha y col. 2009). Por otro lado, a través del tacto transrectal muchas veces es posible evacuar contenido para evaluarlo, aunque esta técnica no debería ser la de elección ya que presenta menor sensibilidad diagnóstica que las mencionadas anteriormente.

Tratamiento: Es aconsejable realizar un tratamiento en aquellos animales que presenten al menos dos signos de metritis (temperatura rectal $>39.5^{\circ}\text{C}$, anorexia, decaimiento, descarga uterina anormal). En aquellos animales que lo requieran, se encuentra indicado el uso de antibióticos sistémicos como tratamiento de elección.

Dentro de los antibióticos recomendados se encuentra el ceftiofur en dos presentaciones: clorhidrato (2,2 mg/Kg cada 24 hs. por 3 a 5 días) y el ceftiofur formulación ácido libre cristalino

(6,6mg/kg 1 aplicación subcutánea en la parte posterior de la oreja). Una de las ventajas más importantes del ceftiofur es que no tiene retiro en leche, por lo tanto no es necesario su descarte (Reppert 2015).

Otro antibiótico utilizado para el tratamiento de las metritis es la oxitetraciclina (20mg/kg cada 24 h durante 3 a 5 días o 1-2 aplicaciones en caso de las formulaciones de larga acción).

Se debe considerar en los casos más severos la administración de un tratamiento de sostén (fluidoterapia, fuente de calcio y energía).

Otros tratamientos: trabajos realizados indican que el uso de antibióticos intrauterinos no resultan eficaces para el tratamiento de metritis. Por otro lado el uso de antiinflamatorios no esteroides como tratamiento de sostén tampoco parecería tener beneficios (Drillich y col. 2007). La Oxitocina, los Estrógenos y la PGF_{2α}, no están recomendados para el tratamiento de metritis.

Endometritis clínica

Definición: La endometritis es la inflamación del endometrio, por lo que a diferencia de las metritis, sólo la capa más interna del útero es afectada. Se presenta a partir de los 21 dpp y se caracteriza por la presencia de contenido en el útero y descargas vaginales.

Signos clínicos: El animal no manifiesta sintomatología sistémica, presenta contenido uterino de cantidad variable y descargas uterinas purulentas o mucopurulentas que en algunos casos pueden evidenciarse manchando la vulva, garrones y cola.

Diagnóstico: Se basa en la evaluación de las características de la descarga vaginal. La misma puede ser obtenida por distintos métodos (palpación vaginal-flujeo, Metrichek, vaginoscopía), como fue explicado para el diagnóstico de metritis. Otros métodos diagnósticos son la USG y la palpación transrectal.

El flujo vaginal se clasifica en cuatro grados según sus características: flujo normal translúcido sin flóculos de pus (F0), flujo con flóculos de pus (contenido purulento <50%) (F1), flujo purulento sin olor (contenido purulento >50%) (F2), y flujo purulento o amarronado con olor fétido (F3). Aquellos animales que presenten F1, F2 o F3 son considerados con endometritis clínica. (Dominguez y col. 2006, Sheldon y col. 2006).

La prevalencia de endometritis clínica es variable llegando a afectar al 37% de las vacas postparto. Es importante tener en cuenta que existe una tendencia a la autocura a medida que avanzan los días postparto, por lo que se debe tener en cuenta el momento en que se realiza el diagnóstico (LeBlanc 2008, Plontzke y col. 2011).

Tratamiento: La eficacia de los tratamientos de la endometritis clínica sigue generando controversias, actualmente los más utilizados son los tratamientos intrauterinos sin descarte en leche como la cefapirina benzatinica 500mg y la rifaximina 13,3 mg. También la aplicación de PGF_{2α} es muy utilizada en estos casos, aunque no debería ser el de elección en vacas que no presenten cuerpo lúteo. Otros tratamientos son los intrauterinos con descarte en leche como los pesarios de oxitetraciclina y los tratamientos sistémicos con antibióticos.

Endometritis subclínica

Definición: La endometritis subclínica se diagnostica a partir de los 21 dpp, es asintomática, y se caracteriza por una inflamación del endometrio que genera, al igual que la endometritis clínica, una reducción de la eficiencia reproductiva del animal (Madoz y col. 2014).

Signos clínicos: No se acompaña de signos clínicos, las vacas presentan flujo normal (F0) translucido, sin contenido purulento.

Diagnóstico: La inflamación subclínica del endometrio necesita, para poder ser diagnosticada, de algún método complementario como el análisis citológico, debido a que el animal no presenta ningún signo local o general que oriente a pensar en la existencia de una patología uterina (Sheldon y col. 2006). Las muestras para citología pueden ser obtenidas principalmente por medio de dos técnicas: cytobrush (Kasimanickam y col. 2004, 2005a, Lenz y col. 2007) y lavaje uterino (Gilbert y col. 1998, Gilbert y col. 2005). De las técnicas mencionadas, el cytobrush es de elección por ser una técnica confiable que no genera alteración celular (como sucede con el lavaje uterino) y a su vez, de mayor practicidad. Se basa en la obtención de células endometriales, mediante un cepillado de la superficie interna del útero (Kasimanickam y col. 2005a),

En la evaluación de las muestras al microscopio óptico, se determina el porcentaje de neutrófilos sobre células totales. Este porcentaje es indicativo de la presencia o no de inflamación subclínica en el endometrio, y se encuentra correlacionado negativamente con los días en lactancia del animal, por lo que existe una disminución en el número de neutrófilos a medida que se aproxima la completa reparación histológica del útero (Kasimanickam y col. 2005a). Se considera positiva una muestra que presente $\geq 5\%$ de neutrófilos en la citología endometrial entre 21 y 62 dpp (Madoz y col. 2013).

Según estudios realizados en nuestro país, la endometritis subclínica afecta al 17% de las vacas clínicas normales y provoca en estas un alargamiento de 30 días en el intervalo parto concepción en comparación con vacas sin endometritis subclínica (Madoz y col. 2013).

Tratamiento: Actualmente no existe un tratamiento de elección. Distintos estudios han probado la efectividad de aplicaciones de PGF_{2α}, antiinflamatorios no esteroides, antibióticos intrauterinos y protocolos de sincronización sin resultados repetibles y contundentes de efectividad (Kasimanickam y col. 2005b, Kasimanickam y col. 2006, Galvão y col. 2009, Priest y col. 2013)

Minimizar los factores de riesgo como norma preventiva sigue siendo la principal herramienta con la que se cuenta en la actualidad para disminuir su impacto sobre la eficiencia reproductiva del rodeo.

Piómetro

Definición: La piómetra se define como la acumulación de material purulento o mucopurulento en la luz uterina en presencia de un cuerpo lúteo persistente y cérvix cerrado (Sheldon y col. 2008).

Etiopatogenia: Generalmente los casos de piómetra se dan en el postparto cuando la primera ovulación ocurre en presencia de contaminación o infección bacteriana. La P4 producida por ese cuerpo lúteo hace que el cérvix se encuentre cerrado impidiendo la eliminación del contenido uterino. La presencia del contenido purulento intrauterino no permite una normal luteólisis por lo que el cuerpo lúteo se vuelve persistente. La P4 continúa dominando el plano hormonal y suprime los mecanismos de defensa uterinos (Youngquist 1997).

Otra forma de presentación de la piómetra es post servicio, se presenta como un signo de Trichomoniasis en hembras infectadas con *Trichomonas foetus*, principalmente en rodeos de carne con servicio natural (Youngquist 1997).

Signos clínicos: El signo más característico que presentan las vacas con piómetra es anestro causado por el cuerpo lúteo persistente. No hay descargas vulvares, salvo en aquellos casos excepcionales en los que el cérvix no se encuentra completamente cerrado.

Diagnóstico: Se puede realizar por tacto rectal o ecografía. La evaluación clínica a través de tacto rectal revela presencia de cuerpo lúteo, útero distendido y fluctuante, su tamaño puede alcanzar al de una preñez de 5 a 6 meses. La pared uterina se encuentra engrosada y el contenido uterino es más espeso comparado con uno gestante. Los cotiledones y el frémito de la arteria uterina, que son característicos de una preñez normal, están ausentes en los casos de piómetra.

A través de la evaluación ecográfica se confirma el diagnóstico. El contenido uterino se observa como zonas anecoicas con puntillado hiperecoico correspondiente al material

purulento (Scott y col. 2011). Afecta aproximadamente al 5% de las vacas de tambo (Knudsen y col. 2015) (Domínguez y col. 2014)

Tratamiento: Se realiza aplicando una dosis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ con el objeto de lisar el cuerpo lúteo y de esta forma permitir la apertura del cérvix y la eliminación del contenido purulento del útero.

Retención de membranas fetales

Definición: Es el retraso en la eliminación de las membranas fetales luego del parto, se la considera como retención luego de haber transcurrido 12-24 hs del parto. Es una complicación del parto bastante común en bovinos y es un predisponente importante para la presentación de infecciones uterinas y por lo tanto, como predisponente de subfertilidad.

Etiopatogenia: La retención de membranas fetales ocurre debido a una falla en el normal proceso de separación y expulsión de la placenta. Los factores que la provocan son aquellos que interfieren en la separación de las microvellosidades de los cotiledones fetales con las criptas de las carúnculas y de aquellos que interfieren con la contractilidad uterina durante el parto.

Dentro de los predisponentes a la retención de membranas fetales se encuentran los abortos, el nacimiento de mellizos, los partos distócicos, la torsión uterina, los partos inducidos, las deficiencias nutricionales, la hipocalcemia como así también el estrés calórico. (Noakes y col. 2008, Beagley y col. 2010).

Signos clínicos y diagnóstico: Es evidente en los casos en que se visualizan las membranas fetales protruyendo de la vulva y en muchos casos colgando hasta el nivel de las ubres o de los tarsos. En los casos menos evidentes, en las que las membranas quedan retenidas en el útero y se proyectan solo hacia dentro del cérvix o de la vagina, es necesario realizar un examen vaginal para detectarlas (Divers y Peek 2008).

El resto de la signología puede variar de acuerdo a las infecciones asociadas a la retención de membranas como por ejemplo, el desarrollo de metritis; pueden despedir olor fétido (Divers y Peek 2008).

La prevalencia de retención de membranas fetales en vacas de tambo ronda el 3 al 12% (Drillich y col. 2006b).

Tratamiento: Existen controversias en cuanto al tratamiento de la retención de membranas fetales. Una gran variedad de tratamientos se han probado, aunque la eficacia de muchos de ellos es cuestionable.

En términos generales, se indica un tratamiento antibiótico sistémico en el caso que el animal presente signos sistémicos como fiebre y decaimiento. El antibiótico que se recomienda es ceftiofur (1 mg/Kg por 3-5 días) (Drillich et al., 2006b).

No es aconsejable la remoción manual de la placenta ya que podría lesionar y afectar a la futura fertilidad del vientre, ni el uso de antibióticos intrauterinos (Drillich y col. 2006a). Puede ser beneficioso recortar las membranas lo más cerca posible de la vulva con el propósito de prevenir infecciones ascendentes (Porrás Almeraya 2010).

Las aplicaciones de PGF_{2α} y de oxitocina no se recomiendan como preventivo al momento del parto ni como tratamiento de la retención, solo podrían ser efectivas en aquellos casos en los que la retención de membranas fetales se deba a atonía uterina, se cree que dicha causa ocurre en un porcentaje muy bajo (Beagley y col. 2010).

La separación de las membranas retenidas ocurrirá sin tratamiento por necrosis de las carúnculas dentro de los 6 a 10 días, con un máximo de 17 días postparto (Youngquist 1997)

Síndrome de vaca repetidora

Definición: Las vacas repetidoras (VR) son vacas subfértiles clínicamente sanas, que han recibido ≥ 3 IA a intervalos regulares de tiempo (17-25 días), y permanecen vacías (Casida 1961, Perez-Marin y Espana 2007). La importancia de este síndrome se debe a las pérdidas económicas que produce (Yusuf y col. 2010).

Etiopatogenia: Las causas de VR incluyen la combinación de desórdenes nutricionales, infecciones, desbalances hormonales, factores genéticos y problemas de manejo (Bage y col. 2002, Salasel y col. 2010). Hasta el momento, no se ha podido determinar si las VR tienen una falla en la concepción y/o a muertes embrionarias muy tempranas (0 a 7 días post concepción) o tempranas (8 a 24 días post concepción).

Signos clínicos: Las VR no presentan signos clínicos de enfermedad. Se caracterizan por tener ≥ 3 IA y no quedar preñadas. La prevalencia de VR es del orden de 10 al 24% (Salasel y col. 2010, Yusuf y col. 2010).

Diagnóstico: Identificación de vacas clínicamente sanas (sin: problemas podales, mastitis, infecciones uterinas, quistes ováricos, etc) con ≥ 3 IA y vacías.

Tratamiento: En los últimos años se han propuesto distintos tratamientos hormonales:

Uso de protocolos de sincronización con benzoato de estradiol + P4 + PGF_{2α}, para evitar la ovulación de ovocitos envejecidos y brindar un aporte de P4 previo a la IA (Alnimer y Husein 2007, Katagiri y Takahashi 2008).

Administración de GnRH al momento de la IA para inducir la ovulación y de esta forma evitar la ovulación de ovocitos envejecidos (Kharche y Srivastava 2007).

Incrementar los niveles de P4 durante el período de reconocimiento materno de gestación mediante la administración de hCG o GnRH o dispositivo intravaginal de P4 (por 7 días) alrededor del día 5 post IA (Kendall y col. 2009).

Utilización de VR como receptoras en los protocolos de transferencia embrionaria para incrementar la probabilidad de mantener la gestación en aquellos casos donde la calidad del ovocito se encuentra afectada (Son y col. 2007, Rodrigues y col. 2010).

Debido a que el síndrome de VR es multicausal, no existe un único tratamiento de elección. Los tratamientos antes mencionados podrían ayudar a restablecer la fertilidad en algunos casos de VR.

Bibliografía

- Alnimer, M. A. y Husein, M. Q. (2007). "The effect of progesterone and oestradiol benzoate on fertility of artificially inseminated repeat-breeder dairy cows during summer". *Reprod Domest Anim* 42 (4), pp. 363-9
- Bage, R., Gustafsson, H., Larsson, B., Forsberg, M. y Rodriguez-Martinez, H. (2002). "Repeat breeding in dairy heifers: follicular dynamics and estrous cycle characteristics in relation to sexual hormone patterns". *Theriogenology* 57 (9), pp. 2257-69
- Beagley, J. C., Whitman, K. J., Baptiste, K. E. y Scherzer, J. (2010). "Physiology and treatment of retained fetal membranes in cattle". *J Vet Intern Med* 24 (2), pp. 261-8
- Casida, L. (1961). "Present status of the repeat breeder cow problem". *J Dairy Sci* 44 pp. 2323-2329
- Divers, T. y Peek, S. (2008). *Rebhun's Diseases of dairy cattle*. (2°). Saunders, Elsevier.
- Dominguez, G., Magnasco, M., Magnasco, R., Hernandez, J., Risco, C. y de la Sota, R. (2006). "Effect of clinical endometritis on reproductive performance in Holstein cows in Argentina". *Theriogenology* 66 pp. 679-680
- Domínguez G, Gaich M, Ravera E, Corva S, De la Sota RL (2014). "*Esquemas de sincronización de celo en rodeos lecheros, ventajas de la ecografía e impacto en la eficiencia reproductiva*". Mercolactea. Rosario, Santa Fé. Mayo 2014.
- Drillich, M., Mahlstedt, M., Reichert, U., Tenhagen, B. A. y Heuwieser, W. (2006a). "Strategies to improve the therapy of retained fetal membranes in dairy cows". *J Dairy Sci* 89 (2), pp. 627-35
- Drillich, M., Reichert, U., Mahlstedt, M. y Heuwieser, W. (2006b). "Comparison of two strategies for systemic antibiotic treatment of dairy cows with retained fetal membranes: preventive vs. selective treatment". *J Dairy Sci* 89 (5), pp. 1502-8
- Drillich, M., Voigt, D., Forderung, D. y Heuwieser, W. (2007). "Treatment of acute puerperal metritis with flunixin meglumine in addition to antibiotic treatment". *J Dairy Sci*. 90 (8), pp. 3758-3763
- Galvão, K., Frajblat, M., Brittin, S., Butler, W., Guard, C. y Gilbert, R. (2009). "Effect of prostaglandin F2 α on subclinical endometritis and fertility in dairy cows". *J. Dairy Sci*. 92 pp. 4906-4913
- Gilbert, R. O., Shin, S. T., Guard, C. L. y Erb, H. (1998). "Incidence of endometritis and effects on reproductive performance of dairy cows". *Theriogenology* 49 pp. 1
- Gilbert, R. O., Shin, S. T., Guard, C. L., Erb, H. N. y Frajblat, M. (2005). "Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows". *Theriogenology* 64 pp. 1879-1888

- Giuliodori, M., Rodriguez, J., Magnasco, R., Lacau, I., Risco, C. y De la Sota, R. (2011). "Puerperal metritis in dairy cows: risk factors, efficacy of ceftiofur therapy and reproductive efficiency". *Clinical Theriogenology* 3 pp. 383
- Giuliodori, M. J., Magnasco, R. P., Becu-Villalobos, D., Lacau-Mengido, I. M., Risco, C. A. y de la Sota, R. L. (2013). "Metritis in dairy cows: risk factors and reproductive performance". *J Dairy Sci* 96 (6), pp. 3621-31
- Hatler, T. B., Hayes, S. H., Ray, D. L., Reames, P. S. y Silvia, W. J. (2008). "Effect of subluteal concentrations of progesterone on luteinizing hormone and ovulation in lactating dairy cows". *Vet J* 177 (3), pp. 360-8
- Kasimanickam, R., Cornwell, J. M. y Nebel, R. L. (2006). "Effect of presence of clinical and subclinical endometritis at the initiation of Presynch-Ovsynch program on the first service pregnancy in dairy cows". *Anim Reprod Sci* 95 (3-4), pp. 214-23
- Kasimanickam, R., Duffield, T. F., Foster, R. A., Gartley, C. J., Leslie, K. E., Walton, J. S. y Johnson, W. H. (2004). "Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows". *Theriogenology* 62 (1-2), pp. 9-23
- Kasimanickam, R., Duffield, T. F., Foster, R. A., Gartley, C. J., Leslie, K. E., Walton, J. S. y Johnson, W. H. (2005a). "A comparison of the cytobrush and uterine lavage techniques to evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows". *Can Vet J* 46 (3), pp. 255-9
- Kasimanickam, R., Duffield, T. F., Foster, R. A., Gartley, C. J., Leslie, K. E., Walton, J. S. y Johnson, W. H. (2005b). "The effect of a single administration of cephalixin or cloprostenol on the reproductive performance of dairy cows with subclinical endometritis". *Theriogenology* 63 (3), pp. 818-30
- Katagiri, S. y Takahashi, Y. (2008). "A progestin-based treatment with a high dose of estradiol benzoate normalizes cyclic changes in endometrial EGF concentrations and restores fertility in repeat breeder cows". *The Journal of Reproduction and Development* 54 (6), pp. 473-9
- Kendall, N. R., Flint, A. P. y Mann, G. E. (2009). "Incidence and treatment of inadequate postovulatory progesterone concentrations in repeat breeder cows". *The Veterinary Journal* 181 (2), pp. 158-62
- Kharche, S. D. y Srivastava, S. K. (2007). "Dose dependent effect of GnRH analogue on pregnancy rate of repeat breeder crossbred cows". *Anim Reprod Sci* 99 (1-2), pp. 196-201
- Knudsen, L. R., Karstrup, C. C., Pedersen, H. G., Agerholm, J. S., Jensen, T. K. y Klitgaard, K. (2015). "Revisiting bovine pyometra--new insights into the disease using a culture-independent deep sequencing approach". *Vet Microbiol* 175 (2-4), pp. 319-24
- LeBlanc, S. J. (2008). "Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: a review". *Vet J* 176 (1), pp. 102-14
- Lenz, M., Drillich, M. y Heuwieser, W. (2007). "[Evaluation of the diagnosis of subclinical endometritis in dairy cattle using ultrasound]". *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 120 (5-6), pp. 237-44

- Madoz, L. V., Giuliadori, M. J., Jaureguiberry, M., Plontzke, J., Drillich, M. y De la Sota, R. L. (2013). "The relationship between endometrial cytology during estrous cycle and cutoff points for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows". *J Dairy Sci* 96 (7), pp. 4333-9
- Madoz, L. V., Giuliadori, M. J., Migliorisi, A. L., Jaureguiberry, M. y de la Sota, R. L. (2014). "Endometrial cytology, biopsy, and bacteriology for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows". *J Dairy Sci* 97 (1), pp. 195-201
- Noakes, D., Parkinson, T. y England, G. (2008). *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics* (8°). Saunders, Elsevier.
- Perez-Marin, C. C. y Espana, F. (2007). "Oestrus expression and ovarian function in repeat breeder cows, monitored by ultrasonography and progesterone assay". *Reprod Domest Anim* 42 (5), pp. 449-56
- Pleticha, S., Drillich, M. y Heuwieser, W. (2009). "Evaluation of the Metrichheck device and the gloved hand for the diagnosis of clinical endometritis in dairy cows". *J Dairy Sci* 92 pp. 5429-5435
- Plontzke, J., Madoz, L. V., De la Sota, R. L., Heuwieser, W. y Drillich, M. (2011). "Prevalence of clinical endometritis and its impact on reproductive performance in grazing dairy cattle in Argentina". *Reprod Domest Anim* 46 (3), pp. 520-6
- Priest, N. V., McDougall, S., Burke, C. R., Roche, J. R., Mitchell, M., McLeod, K. L., Greenwood, S. L. y Meier, S. (2013). "The responsiveness of subclinical endometritis to a nonsteroidal antiinflammatory drug in pasture-grazed dairy cows". *J Dairy Sci* 96 (7), pp. 4323-32
- Reppert, E. J. (2015). "Evidence for the Use of Ceftiofur for Treatment of Metritis in Dairy Cattle". *Vet Clin North Am Food Anim Pract* pp.
- Rodrigues, C. A., Teixeira, A. A., Ferreira, R. M., Ayres, H., Mancilha, R. F., Souza, A. H. y Baruselli, P. S. (2010). "Effect of fixed-time embryo transfer on reproductive efficiency in high-producing repeat-breeder Holstein cows". *Anim Reprod Sci* 118 (2-4), pp. 110-7
- Salasel, B., Mokhtari, A. y Taktaz, T. (2010). "Prevalence, risk factors for and impact of subclinical endometritis in repeat breeder dairy cows". *Theriogenology* 74 (7), pp. 1271-8
- Scott, P., Penny, C. y Macrae, A. (2011). *Cattle medicine*. Manson Publishing.
- Sheldon, I. M., Cronin, J., Goetze, L., Donofrio, G. y Schuberth, H. J. (2009). "Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle". *Biol Reprod* 81 (6), pp. 1025-32
- Sheldon, I. M., Lewis, G. S., LeBlanc, S. y Gilbert, R. O. (2006). "Defining postpartum uterine disease in cattle". *Theriogenology* 65 (8), pp. 1516-30
- Sheldon, I. M., Williams, E. J., Miller, A. N., Nash, D. M. y Herath, S. (2008). "Uterine diseases in cattle after parturition". *Vet J* 176 (1), pp. 115-21
- Silvia, W. J., Hatler, T. B., Nugent, A. M. y Laranja da Fonseca, L. F. (2002). "Ovarian follicular cysts in dairy cows: an abnormality in folliculogenesis". *Domest Anim Endocrinol* 23 (1-2), pp. 167-77

- Son, D. S., Choe, C. Y., Cho, S. R., Choi, S. H., Kim, H. J., Hur, T. Y., Jung, Y. G., Kang, H. G. y Kim, I. H. (2007). "A CIDR-based timed embryo transfer protocol increases the pregnancy rate of lactating repeat breeder dairy cows". *J Reprod Dev* 53 (6), pp. 1313-8
- Youngquist, R. (1997). *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. (1°). Saunders Elsevier.
- Yusuf, M., Nakao, T., Ranasinghe, R. B., Gautam, G., Long, S. T., Yoshida, C., Koike, K. y Hayashi, A. (2010). "Reproductive performance of repeat breeders in dairy herds". *Theriogenology* 73 (9), pp. 1220-9

CAPITULO 48

Nenatología bovina

María Jaureguiberry, Joaquín Chiozza Logroño

Introducción

El período neonatal comprende desde el nacimiento del neonato hasta el día 28 de edad. Dentro de éste se encuentra el período perinatal que comprende las primeras 48 hs de vida. Este último es un período crítico, ya que la tasa de mortalidad perinatal representa, aproximadamente, el 50% del total de las muertes de terneros (Szenci 2012). Las principales causas de muerte perinatal son la acidosis respiratoria y metabólica (Bleul 2009). Estos desordenes se deben, principalmente, a la hipoxia causada por partos distócicos o mal asistidos de neonatos nacidos a término. En el caso de los terneros prematuros, el principal problema es la falta de desarrollo y maduración de sus órganos (Bleul 2009).

Una evaluación clínica completa y simple del recién nacido permite detectar a los terneros que presenten menor vitalidad, lo que nos permite llevar a cabo los tratamientos y cuidados necesarios.

El feto durante el parto y peri-parto

Parámetros como la presión parcial de oxígeno (po_2), presión parcial de dióxido de carbono (pco_2), el pH sanguíneo y el equilibrio ácido-base fetal se encuentran relativamente estables durante la gestación hasta el parto (Mee 2008a). Los cambios en dichos parámetros comienzan

en la segunda etapa del parto, también llamada etapa de expulsión, la cual se caracteriza por contracciones abdominales y uterinas que interrumpen, de forma parcial y transitoria, la llegada de sangre a través del cordón umbilical al feto (Mee 2008a). Esta interrupción del flujo sanguíneo provoca una acidosis respiratoria y metabólica leve (pH alrededor de 7.2) que se da en la mayoría de los terneros nacidos de partos eutócicos y son consideradas como fisiológicas (Bleul y col. 2007). Tanto la acidosis metabólica como la acidosis respiratoria antes mencionada, se resuelven en condiciones normales a las 2 y 24 h, respectivamente, de nacido el ternero (Ravary-Plumioen 2008). En casos en los que el parto se prolonga, como ocurre en los partos distócicos, la acidosis respiratoria y metabólica se hacen más pronunciadas y la vitalidad del ternero recién nacido se ve comprometida. El grado de desequilibrio ácido-base que se produce en esos casos, está directamente relacionado con la duración de la fase de expulsión del feto, el tipo de asistencia usada en el parto y la fuerza de tracción ejercida sobre el ternero (Szenci 2012). Así mismo, en partos prematuros la vitalidad del ternero también se ve comprometida pero en estos casos se debe principalmente a la falta de desarrollo y maduración de sus órganos (Bleul 2009).

Los mecanismos que producen la acidosis respiratoria y metabólica están relacionados, como se mencionó anteriormente, con una disminución de la llegada de sangre al feto que produce una hipercapnia e hipoxia. Esto hace que los tejidos fetales utilicen la vía anaerobia para obtener energía incrementándose la formación de ácido láctico, que lleva a la acidosis metabólica. A su vez, una hipoxia marcada causa la eliminación de meconio en la cavidad amniótica, es por ello que muchos fetos que nacen de partos distócicos o prolongados tienen el pelo manchado con restos de meconio, incluso en algunos casos pueden aspirarlo, lo que trae serios problemas respiratorios (Bleul 2009).

Los procedimientos obstétricos aumentan los niveles de oxitocina en la vaca, lo cual provoca contracciones uterinas más frecuentes y fuertes haciendo que los períodos de recuperación del feto sean más cortos, llegando en ocasiones a estar ausentes (Rutter 2010). Cuando se ejerce tracción forzada con fuerza excesiva se pueden causar traumas (fractura de costillas, vertebrae), lesiones, inflamaciones, estres, o incluso, en casos extremos, la muerte del recién nacido (Murray 2014). Otra posible consecuencia de la tracción forzada es la ruptura prematura del cordón umbilical, que puede llevar a una acidosis respiratoria marcada (Leslie 2012). Es importante tener en cuenta que la medicación administrada a la madre tiene efectos sobre el feto. Por ejemplo, la Xilacina administrada a la vaca afecta la frecuencia cardíaca del feto produciendo bradicardia, lo que en casos de diestres respiratorio tiene un efecto negativo. Los relajantes uterinos como el Clenbuterol, utilizados para retrasar el parto, o para facilitar maniobras obstétricas, tendrían un efecto beneficioso al inhibir las contracciones uterinas y de esta forma prevenir el deterioro de la condición fetal (Rutter 2010). Por lo tanto debemos tener en cuenta que, tanto las maniobras que se utilizan para asistir partos, como la medicación que se administra en la madre, tienen implicancias sobre el feto.

Una vez que el ternero nace, tiene que adaptarse a la vida extrauterina. El primer gran desafío es comenzar a respirar. Los estímulos que provocan la respiración, dentro de los primeros segundos de vida, están relacionados con el propio parto, con descensos en la temperatura percibidos por receptores cutáneos, y con incrementos en la pCO_2 que estimulan directamente el centro respiratorio (Adamson 1991). Este período de transición, en el que el neonato cambia el tipo de respiración, también incluye los cambios en el sistema circulatorio como el cierre del foramen oval y del conducto arterioso. El otro desafío al que se enfrenta el recién nacido, es adaptarse a la temperatura ambiente, especialmente en climas fríos ya que las bajas temperaturas tienen un efecto negativo en la vitalidad del neonato (Mellado y col. 2013). El rango de temperatura confort es entre 13 y 26°C (Davis y Drackley 2002). Cuando la temperatura ambiente está por debajo de 13°C, el neonato mantiene la temperatura principalmente mediante temblores musculares y por el metabolismo de la grasa parda (Murray 2014). Este tipo de tejido, tiene la capacidad de producir rápidamente calor y de convertir la hormona tiroxina en triyodotironina, la cual se encarga de regular la tasa metabólica y tiene una acción directa en la termogénesis (Symonds y Lomax 1992; Zaninovich 2001). La grasa parda representa, aproximadamente, el 2% del peso total del neonato y es remplazada por grasa blanca durante el primer mes de vida (Hard 2008). A partir de ese momento, los principales mecanismos de termorregulación son los relacionados a movimientos musculares como temblores (Symonds y Lomax 1992).

Evaluación del estado vital del feto

Para establecer si el feto se encuentra con vida dentro del útero de la madre, se trata de desencadenar en él movimientos reflejos. La respuesta a los reflejos tiene valor predictivo positivo, es decir, las respuestas positivas (+) indican que el feto está vivo, pero las negativas (-) o dudosas (+/-) no indican que el ternero está muerto (Bleul y Kahn 2008). Estas últimas pueden estar relacionadas a desequilibrios ácido-base del feto (Szenci 2012).

Reflejo Interdigital: Se desencadena por un fuerte pellizcamiento en la zona interdigital. Cuando es estimulado un feto vigoroso, éste retira inmediatamente el miembro dando un reflejo +, cuando el movimiento es lento o anormal el resultado es +/- y si no hay respuesta decimos que fue -.

Reflejo de Deglución y Succión: El reflejo de succión se estimula introduciendo un dedo en la boca. El feto debe responder haciendo movimientos de mamado. El reflejo de deglución se estimula introduciendo un dedo en la boca y haciendo presión sobre la lengua. El feto responde haciendo movimientos de deglución.

Reflejo Ocular: Se estimula ejerciendo presión sobre los ojos. El feto debe responder haciendo un movimiento de parpadeo.

Palpación Latido Cardíaco: Se palpa con la punta de los dedos sobre la parrilla costal izquierda (Rutter 2010). En fetos con músculos desarrollados puede ser difícil palparlo. La frecuencia normal intrauterina es 80 a 150 latidos /min. En un estudio se demostró que los fetos con taquicardia mostraban una moderada a severa acidosis (Szenci 2012).

Reflejo Podal: Es igual que el reflejo interdigital pero se realiza en los miembros posteriores.

Reflejo Anal: Se estimula tocando la piel del ano o introduciendo un dedo en este. El feto responde con una constricción del esfínter anal.

Palpación del Cordón Umbilical: Se evalúan las pulsaciones y la tensión de los vasos por suave presión digital.

En caso de no poder tomar contacto con el feto, se puede realizar algunos de éstos reflejos por vía rectal.

Estos reflejos se van perdiendo en la medida que disminuye la vitalidad del feto. El primero que desaparece es el reflejo interdigital, seguido por el de succión y por último el de deglución. En presentación posterior, luego del reflejo podal se pierde el anal y por último la pulsación del cordón umbilical.

Evaluación de la vitalidad del ternero recién nacido

La evaluación del recién nacido puede realizarse a través de un sistema simple que permite evaluar la condición general del mismo y predecir, en algún grado, la sobrevivencia de dicho paciente (Veronesi y col. 2009). Esta forma de evaluación fue propuesta en 1953 por la Dra Virginia Apgar, una médica estadounidense especializada en anestesia y pediatría. El test de APGAR consta de la evaluación de 5 parámetros: frecuencia cardíaca, esfuerzo respiratorio, reflejos, tono muscular y color a los cuales se les asigna un puntaje (0, 1 o 2). La suma de dichos puntajes individuales permite clasificar a los infantes según su estado de salud y pronóstico en bueno (8, 9 y 10), intermedio (3, 4, 5, 6) o pobre (0, 1 y 2) (Apgar 1953). Este test fue adaptado en veterinaria para su utilización en las distintas especies (Veronesi y col. 2009). La ventaja de su aplicación es que se puede realizar a campo sin necesidad de contar con equipamiento costoso o tener que realizar determinaciones en el laboratorio (Ravary-Plumioen 2008).

Los terneros que nacen de partos distócicos o partos prematuros, son los que tienen mayor probabilidad de estar en riesgo y por lo tanto son los que tienen que ser atendidos con mayor cuidado (Mee 2008a). El examen clínico determina la vitalidad del neonato a partir de parámetros clínicos y visuales (tabla 1) que evalúan principalmente, de forma directa o indirecta, el equilibrio ácido-base y el grado de hipoxia. Uno de los primeros parámetros que se evalúa es la respiración. Inmediatamente después de nacer el neonato debe comenzar a respirar (dentro de los primeros 30 segundos de vida). Cuando hay ausencia de respiración espontánea por 1 a 5 min. se denomina apnea primaria (Nagy 2009), mientras que cuando hay

ausencia de respiración espontánea por 5 min. o más se denomina apnea secundaria (Nagy 2009). En los casos que el ternero presente acidosis respiratoria vamos a observar taquipnea prolongada (Mee 2008a). La respiración de tipo abdominal también es indicativo de acidosis, en este caso metabólica (Rutter 2010). La posición que adquiere el ternero inmediatamente después de nacido influye en la adaptación del mismo en la vida extra-uterina (Uystepuyst y col. 2002b). El decúbito esternal es la posición de elección y el tiempo que tarda el neonato en adquirirla se utiliza como parámetro de vitalidad junto con la capacidad de mantener la cabeza erguida. Al observar al ternero podemos ver si hay o no presencia de edema en la cabeza, lengua o miembros. Esto podría indicar que el ternero estuvo en el canal de parto por un tiempo prolongado (Nagy 2009). El edema en sí no es una alteración grave, de hecho se resuelve en unos días, pero puede interferir con la ingesta de calostro.

Un neonato con buena vitalidad alcanza una frecuencia cardíaca normal dentro de los primeros minutos de vida, mientras que los que presentan menor vitalidad presentan una taquicardia prolongada seguida de una bradicardia (Mee 2008a). La evaluación de la coloración de las mucosas y el llenado capilar nos da una idea del grado de oxigenación de la sangre (Murray 2014). La respuesta a los reflejos y el tono muscular se ven disminuidos en neonatos con acidosis prolongada o no compensada (Mee 2008a). Estudios indican que el reflejo de succión, solo o como parte de un test-APGAR modificado, puede ser considerado un parámetro de vitalidad (Schulz y col. 1997). Este reflejo puede medirse según la fuerza de succión que ejerce el recién nacido sobre nuestro dedo (escala 1 a 4; 1= no hay respuesta, 2= succión débil, 3= succión moderada y 4= succión fuerte) dentro de las primeras 2 h de nacido (Murray 2014). Los terneros que nacen de partos distócicos tienen un reflejo de succión más débil que aquellos que nacen de partos eutócicos (Murray 2014).

Cuidados pos natales

El cuidado del recién nacido se basa en 5 puntos fundamentales que son la respiración, el equilibrio ácido-base, la termorregulación, la limpieza del cordón umbilical y la toma de calostro.

Cuando, una vez realizado el examen clínico, determinamos que el neonato se encuentra saludable, debemos limpiar el cordón umbilical y ocuparnos de que tome calostro. En aquellos casos en los que determinemos un pobre estado de salud, debemos asistirlo. Como generalmente los problemas en el parto se deben a desequilibrios ácido-base e hipoxia, la atención se va a centrar principalmente en la respiración y circulación (Ravary-Plumioen 2008). Lo primero que debemos hacer es limpiar las vías aéreas superiores y la boca de restos de líquido amniótico. Se puede aspirar el líquido con una bomba de vacío o utilizar una mano enguantada. Colocar al neonato boca abajo, sosteniéndolo de los miembros posteriores, durante menos de 90 segundos también ayuda a limpiar las vías aéreas (Uystepuyst y col. 2002b; Ravary-Plumioen 2008; Nagy 2009). Es importante no excederse de ese tiempo ya que

sino el efecto termina siendo perjudicial. En el caso que lo requiera (terneros débiles o muy débiles), se debe estimular la respiración de forma mecánica. Se pueden utilizar los siguientes métodos: 1) masaje con toallas o paja, esto estimula el nervio frénico, 2) introducción de una hebra de pasto por la nariz, lo que desencadena el reflejo de respiración, 3) Utilización de una aguja hipodérmica en el plano nasal, 4) volcar 5 litros de agua a 5°C sobre la cabeza del ternero inmediatamente de nacido, esto mejora la respiración, aumentando el volumen de inspiración (Uystepuyst y col. 2002a; Nagy 2009). Otra forma de estimular la respiración es la farmacológica, el doxapram es una de las drogas que más se utiliza para dicho fin, ejerce su efecto sobre el centro de la respiración y sobre los quimiorreceptores ubicados en la arteria carótida y aorta (Bleul y Bylang 2012). Su uso en casos de apnea secundaria no está indicado (Nagy 2009). Posteriormente, es aconsejable colocar al neonato en decúbito esternal ya que esta posición tiene un efecto positivo sobre la respiración (Uystepuyst y col. 2002b). Una vez que logramos estimular la respiración, deberíamos re chequear al neonato, y en el caso que sea necesario instaurar un terapia con fluidos que ayuden a equilibrar el balance acido-base (Mee 2008a). Para el secado del ternero se pueden emplear bolsas, pasto seco o toallas y frotar el tórax, también se pueden utilizar lámparas infrarrojas (Uystepuyst y col. 2002a). El lamido de la madre es el mejor método de secado. Por último debemos asegurarnos de desinfectar el ombligo y de la toma de calostro del recién nacido. Para la desinfección umbilical se debe vaciar el ombligo escurriéndolo, abrirlo con dos pinzas, e introducir tintura de yodo o cualquier desinfectante que pueda momificar el ombligo ya que es importante que seque rápido. La desinfección es más efectiva cuando se aplica dentro de los 15 minutos después de nacimiento, hacerlo luego de las 8 h del nacimiento es prácticamente inútil. El calostrado del neonato es fundamental, por ello se explicara con más detalle a continuación.

Calostro

El eje fundamental para la salud y supervivencia del ternero es el consumo temprano y adecuado de calostro de alta calidad.

El calostro es la primera secreción de la glándula mamaria. El mismo presenta varias funciones importantes como la de conferirle inmunidad al ternero a través de sus inmunoglobulinas (Ig) o anticuerpos. También es valioso como primera fuente de nutrientes y además, contiene factores de crecimiento y hormonas de importancia para el funcionamiento y desarrollo del sistema digestivo.

Función protectora contra enfermedades

Los terneros nacen con un sistema inmune inmaduro, incapaz de producir Ig como para desencadenar una respuesta inmune protectora. La placenta sindesmocorial de la vaca constituye un sincitio entre el endometrio materno y la trofoectodermo fetal, que separa la sangre materna y fetal impidiendo la transmisión de inmunoglobulinas en el útero (Weaver y col. 2000). En consecuencia, los terneros nacen agammaglobulinémicos, haciendo que la ingestión y absorción de cantidades adecuadas de Ig calostrales sea esencial para el establecimiento de la inmunidad pasiva.

El intestino delgado del ternero recién nacido tiene una capacidad de absorber macromoléculas, como Ig y proteínas, solo durante las primeras 24-36 h de vida. La pérdida de esta capacidad de absorción se denomina cierre del intestino (Davis y Drackley 2002).

El intestino delgado del recién nacido es poco selectivo en cuanto a la absorción de macromoléculas y partículas. Esta característica hace que los terneros privados de calostro puedan absorber bacterias, desarrollando septicemias. Según un estudio realizado por Corley y col. (1977), en el que utilizaron la prueba de provocación bacteriana, se demostró que la absorción intestinal de bacterias en los terneros que no habían tomado calostro era inmediata, mientras que no se observó absorción en los terneros que habían tomado calostro. Por lo tanto, además de proveer Ig, el consumo temprano de calostro es importante para prevenir septicemias al disminuir la colonización y absorción de bacterias patógenas entéricas. Sumado a esto, las Ig confieren una inmunidad local contra las infecciones virales y contra las enterotoxinas bacterianas que causan diarrea (Davis y Drackley 2002).

El calostro contiene más de 10^6 células inmunes maternas por mililitro, incluyendo linfocitos T y B, neutrófilos y macrófagos. Se sabe que estas células se absorben en el intestino del ternero recién nacido y permanecen funcionales (Davis y Drackley 2002). Muchos trabajos demuestran la importancia de estas células para la protección contra Rotavirus y para el desarrollo de una respuesta inmune hacia antígenos inespecíficos (Davis y Drackley 2002). También se presentan sustancias como las citoquinas que son importantes para el inicio de la respuesta inmune del ternero y para la regulación de la actividad de las células inmunes maternas absorbidas. Además, el calostro contiene una variedad de agentes antimicrobianos, incluidos los inhibidores de la tripsina, lactoferrina, lisozima, y el sistema lactoperoxidasa, que confieren una protección local contra bacterias patógenas (Davis y Drackley 2002).

Importancia nutricional del calostro

El calostro es una fuente rica en nutrientes, contiene casi el doble de sólidos totales que la leche. Esta diferencia es debida principalmente, al mayor contenido de proteínas totales de las

cuales una gran proporción son Ig, las cuales disminuyen con rapidez en los sucesivos ordeños. El contenido de proteínas y grasa también es más alto en el calostro, al igual que muchos minerales, oligoelementos, y vitaminas. La energía aportada por las grasas y la lactosa es crítica para la termogénesis y el mantenimiento de la temperatura corporal. Los terneros nacen con pocas reservas energéticas. Solo alrededor del 3% de su peso vivo son lípidos, comparado con casi el 16% en el caso de los bebés humanos, además, la mayoría de los lípidos son estructurales y no de reserva energética. Las reservas energéticas con las que el ternero nace se agotan dentro de las 18 h de vida, por lo tanto, es crítico para el ternero recién nacido obtener nutrientes lo antes posible (Davis y Drackley 2002).

El sistema digestivo de los terneros recién nacidos presenta adaptaciones que minimizan la digestión de las Ig. La limitada secreción ácida y la baja actividad proteolítica junto con la falta de retención de las Ig en el coagulo abomasal, favorecen el pasaje de las Ig hacia el intestino. Además, el calostro posee ciertos factores como la antitripsina, que podrían ayudar a proteger las IgG y otras proteínas antimicrobianas de la acción de enzimas proteolíticas (Davis y Drackley 2002).

Aporte de factores de crecimiento y hormonas

El calostro contiene muchos factores de crecimiento como los de tipo insulina I y II, epidérmicos, de transformación y de crecimiento nervioso; y hormonas como la insulina, cortisol y tiroxina. No se conoce muy bien el papel de estos factores de crecimiento y hormonas sobre el desarrollo del sistema gastrointestinal u otros sistemas. Algunos trabajos han demostrado que influyen en el desarrollo de transportadores de azúcar a nivel intestinal (Davis y Drackley 2002). Burrin y col. (1992), demostraron en lechones recién nacidos, que estos factores y hormonas estimulan la síntesis proteica en el intestino, hígado, riñón, bazo y musculo esquelético, como también estimulan el desarrollo de las vellosidades intestinales. Estos ensayos sugieren la importancia de estos componentes en el desarrollo y maduración del aparato digestivo. Por otro lado, también se han demostrado cambios marcados en la secreción de varias hormonas que actúan en el intestino, Aunque sus efectos no son muy claros, se podría esperar que tuvieran influencia sobre el crecimiento, secreción y motilidad del aparato digestivo en desarrollo (Davis y Drackley 2002).

Transferencia pasiva de la inmunidad

Inmunoglobulinas calostrales y su importancia

Las clases de Ig presentes en el calostro son IgG, IgA e IgM, que representan el 85-90%, 5% y 7% respectivamente sobre el total de Ig del calostro. El 80-90% de las IgG calostrales son del tipo G1. La IgG posee una función sistémica y un efecto local en el intestino. La IgM también desempeña un papel importante en la inmunidad intestinal frente a patógenos entéricos, mientras que la IgA es menos efectiva para ellos (Davis y Drackley 2002).

Aunque el papel fisiológico de todas las clases de Ig es importante, el predominio cuantitativo de la IgG hace que la determinación de la misma sea de utilidad como indicador adecuado de la transferencia pasiva de inmunidad. Es más, debido a la gran contribución de las Ig en las proteínas totales séricas, la determinación de estas últimas es un indicador razonable de la cantidad de Ig presentes. Las proteínas totales se pueden medir con relativa facilidad, a partir de una muestra de sangre del recién nacido, mediante refractometría, por simple precipitación de sulfato de zinc o sulfato de sodio, o mediante el test de glutaraldehído (Davis y Drackley 2002; Navarro y col. 2008).

En general se acepta que la falla en la transferencia pasiva se indica por una concentración de IgG sanguínea menor a 10 mg/ml a las 48 h de edad (Management y Nutrition 1995).

Factores que afectan la transferencia pasiva de inmunidad

Para lograr una adecuada inmunidad pasiva se requiere que el ternero tenga la capacidad de recibir y de absorber la cantidad suficiente de Ig calostrales.

Durante las primeras horas de vida, los enterocitos del intestino delgado tienen la capacidad única de absorber en forma no selectiva una variedad de macromoléculas, incluyendo inmunoglobulinas (Weaver y col. 2000). La transferencia de inmunoglobulina a través del epitelio intestinal es óptima en las primeras 4 h después del parto y comienza a declinar rápidamente después de 12 h postparto. En terneros, el cierre se produce aproximadamente a las 24 h posparto, aunque si la alimentación se retrasa, el cierre puede extenderse a 36 h. Se han determinado varios factores que influyen sobre la absorción de Ig como el estrés por calor, el estrés por frío que induce hipotermia y la distocia grave (Davis y Drackley 2002).

Cantidad de inmunoglobulinas consumidas

Se considera que una concentración de 10 mg/ml es indicativa de una adecuada transferencia pasiva de inmunidad. Para alcanzar este valor se estima que el ternero debe consumir 100 g de IgG lo antes posible.

Utilizando un calostro con un contenido de 30 mg/ml de IgG, se necesitarían 4 L de ese calostro para aportar la cantidad suficiente de IgG. Estas estimaciones demuestran que la obtención de la concentración de IgG buscada en el suero del ternero recién nacido está en función del volumen de calostro consumido y de la concentración de IgG del mismo.

Factores que afectan la concentración de inmunoglobulinas del calostro

La variación del contenido de Ig calostrales entre vacas es muy acentuada. En un estudio en el que analizaron el calostro de 919 vacas se observó que el contenido promedio de IgG1 fue de 48,2 mg/ml, con un desvío estándar de 21,9 mg/ml (Davis y Drackley 2002).

Las IgG se transfieren desde la sangre hacia la glándula mamaria en el último periodo de gestación. El transporte es contracorriente y es mediado por receptores ubicados en el epitelio mamario. Al ocurrir la transferencia de IgG antes del parto, si se pre ordeña la vaca o si hay escape de calostro, se produce una pérdida de Ig que hacen que disminuya la calidad del calostro después del parto. Lo mismo ocurre en partos prematuros o en vacas con periodos de secas demasiado largos o demasiado cortos, menores de 3 semanas. Este último debido al menor tiempo de acumulación de Ig en la glándula mamaria (Davis y Drackley 2002; Mendonsa 2011).

Solo el primer ordeño después del parto es calostro verdadero, ya que las concentraciones de Ig disminuyen drásticamente en los ordeños sucesivos. Además de este aspecto, es importante el tiempo transcurrido entre el parto y el primer ordeño, ya que a medida que pasa el tiempo disminuyen las concentraciones de Ig. Godden (2008), reportó que un retraso del primer ordeño de 14 h resultó en una disminución del 33% en la concentración de IgG. Otro factor importante es el número de partos. En vacas de primer parto la concentración de Ig es 1.3 a 1.6 veces menor que en vacas multíparas (Davis y Drackley 2002; Mendonsa 2011). Esto, posiblemente se deba a un menor tiempo de exposición a antígenos y a que los mecanismos de transporte sean inmaduros en animales jóvenes. También se observó que los animales de cuarta lactancia tuvieron una concentración más alta IgG1 que los de primera, segunda y tercera lactancia (Mendonsa 2011).

El volumen de calostro del primer ordeño es un factor significativo en la determinación de la concentración de Ig en el calostro. En un estudio realizado en la universidad de Washington, un volumen de primer ordeño menor a 8,5 kg fue sugerido como criterio para seleccionar calostros de calidad, ya que valores mayores producciones pueden ejercer un efecto dilutorio, generando calostros de mala calidad (Davis y Drackley 2002).

En general, la raza Jersey produce calostro con una mayor concentración de Ig comparados con la raza Holstein (Godden 2008). De hecho, muy pocas vacas Holstein

producen una excelente calidad del calostro. No obstante, la mayor variación se observa entre vacas de una misma raza (Davis y Drackley 2002).

Alimentación y manejo del calostro

La alimentación de calostro se basa en tres principios. Primero, el calostro debe ser administrado en forma rápida maximizando la absorción de Ig, nutrientes, factores de crecimiento, hormonas y células. Segundo, debe ser administrado en la cantidad necesaria para cubrir la demanda de Ig por parte del ternero. Tercero, este calostro debe ser de calidad para proporcionar la cantidad de Ig en el volumen ofrecido.

Manejo de la vaca seca

Las propiedades inmunológicas del calostro pueden ser mejorados mediante la vacunación de vacas al secado. Hay vacunas para mejorar la inmunidad de ternero contra E. coli, clostridios, leptospirosis y la salmonelosis. La selección de las vacunas más apropiadas debe ser basada en la prevalencia de las enfermedades en la zona, información fácilmente disponible de asesores y veterinarios locales.

Determinación de la calidad del calostro

Los terneros recién nacidos necesitan ingerir al menos 100 g de Ig dentro de sus tres hasta seis primeras horas de vida, e idealmente la misma cantidad 12 h más tarde. La calidad del calostro se expresa en gramos de Ig por litro (g/l). Un calostro de excelente calidad contiene al menos 90 g / L, de buena calidad 65-90 g / L, de moderada calidad 40-65 g / L y de mala calidad menos de 40 g / L. El volumen de calostro que debe suministrarse para cumplir con la exigencia de 100 g de Ig puede entonces calcularse a partir de su calidad.

Con los años, ha habido varios intentos de evaluar la calidad del calostro. Desafortunadamente, la evaluación visual es una mala manera de evaluar la calidad porque calostros espesos y cremosos puede ser simplemente indicativo de su alto contenido de grasa, incluso existe una relación negativa entre el nivel de Ig y el contenido de grasa en el calostro. El calostrómetro fue desarrollado específicamente para determinar niveles de Ig, pero estudios posteriores han demostrado sus limitaciones. Una recomendación práctica para su uso es medir el calostro a temperatura ambiente o, mejor aún, a la temperatura recomendada (25°C).

Los calostrómetros son buenos en la detección de muestras pobres, pero por desgracia, están limitados en su capacidad de estimar calostros de calidad (Davis y Drackley 2002).

Varios estudios han confirmado que las vacas no producen buena calidad de calostro en su primer ordeño. El uso de un calostrómetro para evaluar la calidad, clasificando los calostros en base a los criterios mencionados, mostro los siguientes porcentajes de vacas en los dos estudios que producen pobres (43 y 40%), moderada (31 y 37%), buena (23 y 19%) y excelente (4 y 4%). Estos resultados destacan la importancia de identificar vacas que producen calostro de baja calidad poco después del parto y luego alimentar a sus crías con calostros almacenados de buena o excelente calidad (Moran 2002).

Tiempo de administración y cantidad de calostro

La recomendación más importante con respecto al tiempo, es que la administración del calostro debe ser lo antes posible. Como es bien sabido, la mayor tasa de absorción ocurre inmediatamente después del parto y va disminuyendo progresivamente a medida que se demora en la administración de calostro.

Cada media hora después del parto en que se retrasa la alimentación con calostro, la transferencia de anticuerpos disminuye en un 5%. Un ternero que no bebe hasta las 6 h de vida ya ha perdido la oportunidad para que el 30% de los posibles anticuerpos entren en su torrente sanguíneo.

Las recomendaciones actuales para la primera alimentación son ofrecer 3 L en terneros de raza Jerseys y pequeños de raza Holstein y 4 L a terneros Holstein de tamaño medio (Mendonsa 2011), tan pronto como sea posible después del nacimiento. La segunda alimentación de 2 L, o más si el ternero está dispuesto, se puede proporcionar 6 h más tarde, aunque no es realmente necesario alimentar a estos terneros hasta el día siguiente. El calostro y la leche de transición deben ser luego utilizados como alimento líquido durante los primeros días de vida para proporcionar protección local contra la enfermedad.

Métodos de administración del calostro

Al considerar la alimentación con calostro a los terneros lecheros, se debe apreciar que vacas de ordeño modernas son muy diferentes a las primitivas vacas salvajes de las que desarrollado hace miles de años. Sus ubres son mucho más grandes y, a menudo cuelgan demasiado bajo para facilitar el amamantamiento de sus crías. Producen mucho mayores cantidades de leche, lo que significa que su primera y segunda calostro de ordeño está mucho más diluida, lo cual no deseable para una calidad óptima. Además, la habilidad materna tiene

poca relevancia en las granjas lecheras. En cambio en el caso de las vacas de carne, donde el amamantamiento sin ayuda es un medio muy eficiente en la transferencia pasiva de inmunidad en terneros. Estos métodos naturales son menos eficaces en los tambos, lo que significa que los tamberos a menudo tienen que confiar en métodos artificiales.

El calostro debe ser administrado con una mamadera, balde, o a través de una sonda esofágica si el ternero no quiere o no puede mamar. La inserción del tubo puede causar daños en el tracto oral del ternero por lo que debe ser insertado y llevado a cabo con mucho cuidado (Mendonsa 2011). Este último método se adapta bien en establecimientos grandes, asegurando la cantidad de calostro como así también la rapidez en la administración del mismo.

Altas tasas de fallas en la transferencia pasiva de inmunidad se han asociado con terneros que permanecen con su madre y se deja mamar naturalmente. Este problema fue ilustrado por Besser y col. (1991) cuando observaron tasas de fallas en la transferencia pasiva de inmunidad de 61, 19 y 10% en terneros lecheros que recibieron calostro en forma natural amamantando de la madre, a través de una mamadera, y administrado por tubo esofágico, respectivamente. Claramente, los terneros lecheros alimentados por sonda esofágica pueden asegurar una menor tasa de fallas en la transferencia pasiva de inmunidad.

Almacenamiento del calostro

Los métodos de almacenamiento pueden ser calostro refrigerado, el cual dura una semana sin pérdida de calidad, o bien puede congelarse, donde se conserva en buena calidad durante un año. Lo aconsejable es congelar las cantidades que luego serán administradas en una sola toma. Estas pueden ser congeladas en bolsas para freezer, botellas o recipientes herméticos.

En el calostro congelado se recomienda para descongelarlo a 38 ° C o a temperatura ambiente para asegurar la calidad del calostro y de las Ig. También puede ser descongelado en un horno de microondas, siendo crucial utilizarlo a baja potencia y de quitar el calostro descongelado entre los intervalos de calentamiento. Por cualquiera de los dos métodos si el calostro se calienta demasiado las Ig pueden sufrir desnaturalización y pérdida de calidad (Mendonsa 2011).

Bibliografía

- Adamson, S. L. (1991). "Regulation of breathing at birth". *J Dev Physiol* 15 (1), pp. 45-52.
- Apgar, V. (1953). "A proposal for a new method of evaluation of the newborn infant". *Curr Res Anesth Analg* 32 (4), pp. 260-267.
- Besser, T. E., C. C. Gay y L. Pritchett (1991). "Comparison of three methods of feeding colostrum to dairy calves". *J Am Vet Med Assoc* 198 (3), pp. 419-422.
- Bleul, U. (2009). "Respiratory distress syndrome in calves". *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 25 (1), pp. 179-193, vii.
- Bleul, U. y T. Bylang (2012). "Effects of doxapram, prethcamide and lobeline on spirometric, blood gas and acid-base variables in healthy new-born calves". *Vet J* 194 (2), pp. 240-246.
- Bleul, U. y W. Kahn (2008). "Monitoring the bovine fetus during stage II of parturition using pulse oximetry". *Theriogenology* 69 (3), pp. 302-311.
- Bleul, U., B. Lejeune, S. Schwantag y W. Kahn (2007). "Blood gas and acid-base analysis of arterial blood in 57 newborn calves". *Vet Rec* 161 (20), pp. 688-691.
- Burrin, D. G., R. J. Shulman, P. J. Reeds, T. A. Davis y K. R. Gravitt (1992). "Porcine colostrum and milk stimulate visceral organ and skeletal muscle protein synthesis in neonatal piglets". *J Nutr* 122 (6), pp. 1205-1213.
- Corley, L. D., T. E. Staley, L. J. Bush y E. W. Jones (1977). "Influence of colostrum on transepithelial movement of Escherichia coli 055". *J Dairy Sci* 60 (9), pp. 1416-1421.
- Davis, C. L. y J. K. Drackley (2002). *Desarrollo, nutrición y manejo del ternero joven*. (Inter-Médica.
- Godden, S. (2008). "Colostrum management for dairy calves". *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 24 (1), pp. 19-39.
- Hard, K. (2008). "Predictive measures of fetal distress in calves during delivery". Master of science, Iowa State University.
- Leslie, K. (2012). "Health and immune function of dairy calves ". En *Wester Canadian Dairy Seminar* (pp. 177-188).
- Management, B. A. o. y Nutrition (1995). *A Guide to Colostrum and Colostrum Management for Dairy Calves*. (AFIA.
- Mee, J. F. (2008a). "Managing the calf at calving time". En *American Association of Bovine Practitioners Conference Proceedings* (pp. 46-53).
- Mee, J. F. (2008b). "Prevalence and risk factors for dystocia in dairy cattle: a review". *The Veterinary Journal* 176 (1), pp. 93-101.
- Mellado, M., E. Lopez, F. G. Veliz, M. A. De Santiago, U. Macias-Cruz, L. Avendaño-Reyes y J. E. Garcia (2013). "Factors associated with neonatal dairy calf mortality in a hot-arid environment". *Livestock Science* 159 pp. 149-155.

- Mendonsa, K. M. (2011). "Factors Affecting Passive Transfer in Neonatal Calves". [en línea]. Consultado <http://digitalcommons.calpoly.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1048&context=dscisp>.
- Moran, J. (2002). *Calf Rearing: A Practical Guide*. (Landlinks Press.
- Murray, C. (2014). "Characteristics, risk factors and management program for vitality of newborn dairy calves". Doctor Philosophy, University of Guelph.
- Nagy, D. W. (2009). "Resuscitation and critical care of neonatal calves". *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 25 (1), pp. 1-11, xi.
- Navarro, F., N. Trotti y J. M. Raviolo (2008). "Evaluación del calostro por el test del glutaraldehído en terneros de crianza artificial de la Provincia de Córdoba". *Revista Argentina de Producción Animal* 28 pp. 303-334.
- Ravary-Plumioen, B. (2008). "Resuscitation procedures and life support on the newborn calf". En *Dairy Solutions Symposium* (pp. 410-419). Lasalle Beauvais, Francia:
- Rutter, B. (2010). "Neonatología bovina". *Sitio Argentino de producción animal* [en línea]. Consultado <http://www.produccion-animal.com.ar/>.
- Schulz, J., B. Plischke y H. Braun (1997). "[Sucking and drinking behavior as criteria of vitality in newborn calves]". *Tierarztl Prax* 25 (2), pp. 116-122.
- Symonds, M. E. y M. A. Lomax (1992). "Maternal and environmental influences on thermoregulation in the neonate". *Proc Nutr Soc* 51 (2), pp. 165-172.
- Szenci, O. (2012). "Diagnosis of perinatal well-being of dairy calves". *Scientific papers, animal science* 57 pp. 3-11.
- Uystepuyst, C., J. Coghe, T. Dorts, N. Harmegnies, M. H. Delsemme, T. Art y P. Lekeux (2002a). "Effect of three resuscitation procedures on respiratory and metabolic adaptation to extra uterine life in newborn calves". *Vet J* 163 (1), pp. 30-44.
- Uystepuyst, C., J. Coghe, T. Dorts, N. Harmegnies, M. H. Delsemme, T. Art y P. Lekeux (2002b). "Sternal recumbency or suspension by the hind legs immediately after delivery improves respiratory and metabolic adaptation to extra uterine life in newborn calves delivered by caesarean section". *Vet Res* 33 (6), pp. 709-724.
- Veronesi, M. C., S. Panzani, M. Faustini y A. Rota (2009). "An Apgar scoring system for routine assessment of newborn puppy viability and short-term survival prognosis". *Theriogenology* 72 (3), pp. 401-407.
- Weaver, D. M., J. W. Tyler, D. C. VanMetre, D. E. Hostetler y G. M. Barrington (2000). "Passive transfer of colostral immunoglobulins in calves". *J Vet Intern Med* 14 (6), pp. 569-577.
- Zaninovich, A. (2001). "Hormonas tiroideas, obesidad y termogenesis en grasa parda". *Medicina* 61 pp. 597-602.

Tabla 1. Parámetros a evaluar en el ternero recién nacido (Mee 2008b).

Criterio	Buena vitalidad	Mala vitalidad
Respiración	50-75 mov/min. Respiración torácica.	Hiperpnea. Respiración abdominal. Apnea 1º. Apnea 2º.
Pelo-manto	Cubierto de restos de líquidos fetales	Cubierto de restos de meconio
Edema	Sin edema	Cabeza, lengua o miembros.
Mucosas	Rosadas. Llenado capilar normal.	Pálidas o cianóticas. Llenado capilar lento.
Reflejos	Movimiento de cabeza, fuerte respuesta al reflejo corneal, de succión y podal.	Débil respuesta o sin respuesta a dichos reflejos.
Tono muscular	Cabeza erguida dentro de los primeros minutos de vida. Buen tono muscular	Tono muscular flácido.
Frecuencia Cardíaca	100-150 latidos/min. Regular.	>150 latidos/min, seguida de bradicardia (<80). Irregular.
Temperatura rectal	39.0-39.5°C inmediatamente después de nacido. A la hora se estabiliza en 38.5-39.0°C.	39.5-40.0°C inmediatamente después de nacido, luego desciende hasta <38.5°C y no se estabiliza.
Decúbito esternal	Dentro de los primeros 5 min. de nacido.	Permanece en decúbito lateral por tiempos prolongados.
Pararse	Intenta pararse dentro de los 15 min. de nacido y dentro de la hora se para.	Tarda más de 1 h en pararse o no lo hace.
Reflejo de succión	Comienza a mamar dentro de las 2 h de nacido.	Tarda más de 2 h en mamar o no lo hace.

CAPÍTULO 49

Utilización de la ultrasonografía en el manejo reproductivo en explotaciones lecheras

Germán Domínguez, Rodolfo Luzbel de la Sota

Introducción

En la década del 80 se comenzó a utilizar la ultrasonografía para el diagnóstico de estructuras normales y patológicas del aparato reproductor de los bovinos. Desde un inicio se ha utilizado para realizar trabajos de investigación en dinámica folicular, momento de ovulación, desarrollo del cuerpo lúteo, pérdidas de la gestación, y diagnóstico de patologías reproductivas. Más recientemente, con la disminución en el costo de los ecógrafos, hasta la actualidad estos han comenzado a ser utilizados en forma rutinaria en el manejo reproductivo en las explotaciones ganaderas (Descôteaux y col. 2009; Ginther 2014).

Equipamiento

El animal a examinar debe estar correctamente sujetado para poder hacer una buena inspección y para no sufrir lesiones causadas por el animal. Es muy importante acondicionar el lugar del trabajo para que haya menor luminosidad en el mismo, ya que la luz va a interferir en la visión de la pantalla pudiendo cometer errores de interpretación (figura 1a).

Existen equipos portátiles que necesitan de alimentación eléctrica y también existen equipos ultraportátiles que tienen alimentación propia por baterías (figura 1b). El equipo consta de una consola que contiene la electrónica, controles y una pantalla en la que la imagen de ultrasonido es visualizada por el operador. Además consta de un transductor, que emite y recibe ondas de ultrasonido de alta frecuencia. Los transductores pueden ser lineales o sectoriales, los lineales son los más comunes y constan de una matriz de cristales piezoeléctricos dispuestos en forma ventral en una fila adaptado para uso transrectal, mientras que en los sectoriales la matriz de cristales se encuentra ubicada en el frente del transductor adaptado para uso transabdominal o transvaginal. Estos cristales emiten ondas sonoras de alta frecuencia. Existen traductores de 3,5 a 12 MHz, los más utilizados en el manejo reproductivo en bovinos son los traductores de 5 y 7.5 MHz

La ultrasonografía utiliza ondas de sonido de alta frecuencia para producir imágenes de órganos internos y de tejidos. La utilización de la ultrasonografía en medicina se basa en el denominado efecto piezoeléctrico. Este efecto se basa en que cuando un pulso eléctrico alcanza los cristales piezoeléctricos estos emiten un sonido en su frecuencia natural. En forma inversa, si un cristal vibra cuando es alcanzado por el retorno de un eco, se produce un pulso eléctrico. Cuando este principio es aplicado a la ultrasonografía médica, el pulso de una corriente eléctrica produce la vibración de cristales piezo-eléctricos especiales que se encuentran alojados en el transductor de un ecógrafo, que a su vez generan ondas cortas de sonido de alta frecuencia (3.5-7.5 MHz). Estas ondas de sonido impactan sobre una porción de tejido de fino espesor (2mm) pero ancha (50 mm) y producen una imagen bi-dimensional de este tejido. Por lo tanto, las ondas de sonido producidas por el transductor del ecógrafo son dirigidas a través de los tejidos de interés mediante la colocación del transductor sobre el tejido y moviéndolo o variando el ángulo del transductor. Las características ultrasónicas del tejido dictan la habilidad del sonido en reflejarse nuevamente hacia el transductor y convertir el sonido recibido en pulsos eléctricos que son exhibidos como ecos en la pantalla del ecógrafo. Estos ecos son exhibidos en varias tonalidades de grises. Los líquidos, no reflejan las ondas de sonido (anecogénicos o anecoicos) y por lo tanto son exhibidos como imágenes negras (e.g., folículos ováricos y vesículas embrionarias); en tanto que los tejidos densos reflejan una gran proporción de las ondas de sonido (ecogénicos) y por lo tanto son exhibidos en la pantalla estructuras de color gris claro o blanco (e.g., huesos pélvicos, cérvix). Para realizar ultrasonografía en producción y reproducción animal se utiliza comúnmente transductores de tres frecuencias diferentes (i.e., 3.5, 5.0 y 7.5 MHz [millones de ciclos por segundo]). Los transductores que transmiten ondas de alta frecuencia poseen menor poder de penetración de la onda en los tejidos y por lo tanto mayor resolución de la imagen. Por lo tanto una estructura relativamente pequeña como un folículo de 5-15 mm o una vesícula embrionaria de 25 mm son generalmente evaluadas con un transductor de 5.0 o 7.5 MHz. A la inversa, transductores que transmiten ondas de relativamente baja frecuencia-3.5 MHz-tienen un mayor grado de penetración pero una menor resolución y se adaptan mejor para la evaluación de grandes

estructuras ubicadas relativamente lejos del transductor. Este es el caso de fetos y úteros de gestaciones en estadios medios o avanzados, y la evaluación de la calidad y la composición de la res o la carcasa (grasa subcutánea, área de ojo de bife y estimación de la grasa intramuscular o marmoleada (Fricke 2002; Colloton 2011; Ginter 2014).

Ovarios

Las dos estructuras fisiológicas que nos encontramos en los ovarios son los Folículos (FL) y cuerpos lúteos (CL). Los FL se visualizan como estructuras anecoicas de color negro ya que están formados de líquido y por lo tanto no reflejan el ultrasonido. Su pared es muy delgada y generalmente aparecen como estructuras bien redondeadas, pero también pueden aparecer con otras formas por compresión de otras estructuras o del estroma ovárico. Debido a las ondas foliculares presente en el ciclo estral de los bovinos nos encontramos con folículos de distintos tamaño a lo largo del ciclo. Podemos observar folículos preovulatorios de 10-18 mm de diámetro dependiendo de la raza bovina, y también observar folículos de 2-3 mm de diámetro en vacas que aún están en anestro y no han comenzado a ciclar (Pierson 1984; figura 2a y 2b1).

El CL es una glándula endocrina transitoria que se forma después de la ovulación, y se puede visualizar a partir del cuarto o quinto día posovulación. Se visualizan como áreas ecogénicas dentro del estroma del ovario, que pueden observarse como estructuras solidas (figura 2c, 2e) o como estructuras que pueden contener cavidades llenas de líquido que van de los 4mm a 10mm (figura 2d, 2f). El hallazgo de un cuerpo lúteo en vaquillonas nos está indicando que alcanzó la madurez sexual. En un animal adulto la presencia del mismo nos está indicando que se estamos en presencia de un animal que ha reanudado su ciclicidad posparto (Fricke. P. 2002).

Es bastante común encontrar vacas de alta producción con presencia de dos o tres CL que pueden estar ubicados en un mismo ovario o en los dos ovarios (figura 2e, 2f). En un estudio realizado por López et al 2005, ellos reportaron un 22,4 % de doble ovulaciones con un rango de 0% a 51%. Este hallazgo está íntimamente relacionado con la producción diaria de leche. Las vacas con producciones de leche menores a 30 litros diarios no se reportó ovulaciones dobles, pero en cambio para las vacas que producían más de 50 litros diarios se reportó un 51% de ovulaciones dobles.

Quistes

Los quistes son estructuras patológicas comunes de encontrar en razas de bovinos de leche pero poco común en razas de bovinos de carne. Históricamente, se pueden definir como estructuras foliculares con más de 25mm que persisten en el ovario por más de 10 días sin presencia de un CL; y se los puede clasificar en quistes foliculares y quistes luteales (Robert 1976). Más recientemente, con la utilización de la ultrasonografía se pueden definir a los quistes como la presencia de múltiples folículos de 18-20mm en diámetro, con ausencia de CL y con útero flácido a la palpación rectal en vacas lecheras con aceptable condición corporal (Bartolome et al., 2005). Los quistes foliculares presentan pared muy delgada (figura 3a) en cambio los quistes luteales presentan una pared de tejido luteal y puede medir 2 a 4 mm de espesor (figura 3b). La prevalencia de quistes foliculares en vacas lecheras puede ser del 9 al 15% (Bartolome et al., 2005).

Útero y diagnóstico de gestación

El útero presenta diferente ecogenicidad dependiendo de la etapa del ciclo estral. El espesor de los cuernos uterinos comienza a aumentar aproximadamente 3 o 4 días previos a la ovulación y disminuye después de la misma, hasta el día 3 o 4 del ciclo, para mantener su tamaño a lo largo del diestro. Es importante recordar que el día 0 del ciclo es el día de la ovulación, la cual ocurre entre las 24 y 36 h del inicio del estro. También se ha estudiado la presencia de líquido intrauterino. Generalmente el líquido intrauterino comienza a ser visible a los 3 o 4 días previos a la ovulación y decrece hasta el día 3 a 6 del ciclo. El período de máximo contenido de líquido coincide con el período de máxima descarga de mucus durante el estro y metaestro (Pierson 1987).

El diagnóstico de gestación es una de las principales aplicaciones de la ultrasonografía en bovinos lecheros. El objetivo principal en el examen de un animal con un servicio retenido es el diagnóstico rápido de preñez o vacuidad para poder incorporar a las vacas diagnosticadas vacías en un protocolo de inseminación a celo detectado o a tiempo fijo (figura 4a-c; Fricke. P. 2002).

La detección precoz de preñez comienza a tener una efectividad cercana al 98% alrededor de del día 25 de gestación (Fricke. P. 2002). Cuando nos encontramos con útero preñado lo primero que vamos a encontrar presencia de líquido anecoico en el interior del útero. Sin embargo, para confirmar una preñez además del líquido tenemos que ver la presencia del embrión o del feto. Otro momento fisiológico en el que hay acumulación de líquido en el interior del útero es en el proestro o en estro. Sin embargo, la diferencia más importante es que nos

vamos a encontrar con la preñez es que mientras en el celo hay un folículo preovulatorio y un cuerpo lúteo en regresión, en la preñez hay un cuerpo lúteo y no hay folículos preovulatorios (Pierson 1987).

La edad gestacional se puede estimar mediante la medición de diámetro biparietal, cráneo-caudal, torácico, o abdominal. La mayoría de los ecógrafos poseen tablas en las cuales utilizando la medición de la estructura en pantalla, el software propietario del ecógrafo calcula la edad gestacional (Curran y col, 1986; Kahn, 1989). Además, la observación por primera vez de estructuras anatómicas o de comportamientos fisiológicos del embrión/feto permite estimar también la edad gestacional. El alantoides se detecta por primera vez alrededor del día 23; la columna vertebral, los miembros anteriores y el amnios al día 29; los miembros posteriores al día 31; los placentomas al día 35; las pezuñas hendidas y los movimientos fetales al día 45; y las costillas al día 53 de gestación (figura 4a-c ; Curran et al., 1986).

La acumulación de líquido también puede ocurrir en condiciones patológicas en el útero como puede ser una mucómetra o una piómetra (Sheldon et al., 2006). La piómetra se define como acumulación de líquido purulento en el interior del útero con presencia de un cuerpo lúteo persistente y cérvix cerrado (Sheldon et al., 2006). Dentro de las alteraciones patológicas que podemos diagnosticar en el útero, las más comunes de encontrar son la metritis, la endometritis, la endometritis subclínica y piómetra (Kasimanickam et al., 2004; Sheldon et al., 2006). En el útero normal hay presencia de fluido anecoico solo durante el estro. Durante el diestro normalmente no debería haber luz en el útero (figura 5a). La presencia de un fluido anecoico con partículas hiperecoicas en suspensión en el interior del útero es característico de la metritis puerperal, de la metritis clínica, de la endometritis clínica (figura 5c) y de la piómetra (figura 5b; Sheldon et al., 2006). Su diagnóstico se realiza conjuntamente con la signología clínica y los días posparto. El diagnóstico de endometritis subclínica se realiza mediante la observación de líquido en el útero y la ausencia de signos clínicos de endometritis (Kasimanickam et al., 2004).

Gestaciones dobles

Las gestaciones dobles pueden ser unilaterales o bilaterales. En un estudio realizado en España, se encontró que el 40,8% de las preñeces eran bilaterales y un 59,2% de las preñeces eran unilaterales (Lopez-Gatius y Hunter, 2005). Es importante revisar los ovarios para ver la presencia de uno dos CL, en caso que sea una gestación doble unilateral encontraremos dos CL de un lado, en caso de gestaciones bilaterales tendremos un CL en cada ovario. Solo el 4,5% de las gestaciones son monocigotas, osea que vamos a encontrar un solo CL y dos embriones o fetos (figura 6a-c; Colloton, 2011). Cuando estamos en presencia de una gestación doble lo primero que vamos a visualizar es mayor contenido de líquido amniótico. Para confirmar una gestación doble tenemos que encontrar la presencia de los dos embriones

o fetos. Un hallazgo muy común de encontrar es lo denominado línea de mellizos que es la membrana corioalantodea doble entre los embriones o fetos. A la ecografía se visualiza como una línea ecogénica con un punto central hiperecoico. No se debe confundir con las membranas amnióticas que aparece alrededor de cada embrión. No siempre se visible la línea de mellizos, pero cuando se visualiza tenemos que hacer un examen más profundo, debido a que en la mayoría de los casos su presencia nos está indicando gestaciones dobles. La prevalencia de gestaciones dobles se ido incrementando año tras año (Lopez-Gatius y Hunter, 2005).

Pérdidas embrionarias

La mortalidad embrionaria afecta la eficiencia reproductiva en bovinos. La mortalidad embrionaria se refiere a las pérdidas que ocurren durante los primeros 42-45 días de gestación que coincide con la finalización del período de diferenciación del embrión y su pasaje al estadio de feto. Las pérdidas embrionarias a su vez pueden ser clasificadas en mortalidad embrionaria temprana cuando ocurren dentro de los primeros 24 días de gestación y mortalidad embrionaria tardía cuando ocurre entre los días 25 y 45 de gestación (Bartolome, 2009).

Normalmente cuando queremos determinar la viabilidad de un embrión tenemos que identificar el latido cardíaco (normal: 2 x frecuencia materna), la integridad de la membrana amniótica, la separación de la membrana corioalantoidea, el edema endometrio, la ausencia de embrión, y la disminución del tamaño del embrión y de los líquidos amniótico y alantoideo (Figura 7a-c).

Uno de los factores que aumenta la mortalidad embrionaria son las gestaciones dobles (Lopez –Gatius y Hunter, 2005).

Determinación del Sexo

El tubérculo genital es la estructura embrionaria que dará lugar al clítoris en la hembra y al pene en el macho. Inicialmente se observa entre las extremidades posteriores y a medida que progresa la gestación se ubica cerca de la base de la cola en la hembra y detrás del cordón umbilical en el macho. El diagnostico se puede realizar a partir de los 55 días debido a que en la mayoría de los casos termina el proceso de migración. Esto va depender del tipo de animal, de la raza y del equipo que se esté utilizando. La edad ideal para realizar esta técnica varía entre los 55 y 80 días. Después de los 80 días los que hay que identificar es el clítoris y el pene. El tubérculo genital se visualiza como una estructura hiperecogenica y de forma

bilobulada. Para poder identificar la posición del tubérculo genital tenemos que usar como referencia la cabeza, cordón umbilical, la cola y los miembros posteriores (Curran et al., 1989; Quintela Arias et al., 2006).

Conclusiones

La ecografía permite hacer un diagnóstico certero y un seguimiento individual de cada animal. Permite determinar el estadio del ciclo estral e identificar las patologías de útero y de ovario que ocasionan cuantiosas pérdidas económicas si no son detectadas en forma rápida y certera. También, permite identificar las vacas vacías a los 25-28 días de ser inseminadas para poder iniciar nuevamente un protocolo de sincronización. Además se puede evaluar la viabilidad del feto ya que es posible visualizar el latido cardíaco. Por último, la ultrasonografía permite realizar la determinación del sexo feto con un 99 % de eficacia entre los días 60 y 75 de la gestación.

Bibliografía

- Bartolome J, Thatcher WW, Melendez P, Risco C, Archbald, L. 2005. Strategies for the diagnosis and treatment of ovarian cysts in dairy cattle. JAVMA 227: 1409-1414.
- Bartolome J. 2009. Mortalidad embrionaria y fetal temprana de origen no infeccioso en vacas lecheras. VIII Simposio Internacional Reproducción Animal-IRAC. pp 1-10.
- Colloton JD. 2011 Applications of Ultrasonography in Dairy Cattle. Reproductive Management. Dairy Production Medicine. Edited by Carlos A. Risco, Pedro Melendez Retamal.
- Curran S, Pierson R, Ginther OJ. 1986. Ultrasonographic appearance of the bovine conceptus from day 10 through 20. JAVMA 189:1289-1294
- DesCôteaux L, Giovanni G, Colloton J. 2009. Ultrasonography of the Bovine Female Genital Tract. Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice 25:733-752.
- Fricke P, Lamb GC. 2002. Proceedings of The Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle Workshop, September 5-6. Manhattan, Kansas.
- Fricke P. 2002. Scanning the Future-Ultrasonography as a Reproductive Management Tool for Dairy Cattle. J. Dairy Sci 85:1918–1926.
- Ginther OJ. 2014. How ultrasound technologies have expanded and revolutionized research in reproduction in large animals. Theriogenology 81: 112–125.
- Hanzen CH, Pieterse M, Scenczi O, Drost M. 2000. Relative accuracy of the identification of ovarian structures in the cow by ultrasonography and palpation per rectum. The Veterinary Journal 159 :161-170
- Kahn W. Veterinary Reproductive Ultrasonography. 2004. Schluetersche, Berlin, Germany. p256.
- Kasimanickam R, Duffield TF, Foster RA, Gartley CJ, Leslie KE, Walton JS, Johnson WH. 2004. Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. Theriogenology 62:9–23
- Lopez-Gatius H, Hunter. 2005. Spontaneous reduction of advanced twin embryos: its occurrence and clinical relevance in dairy cattle. Theriogenology 63: 118–25.
- Lopez H, Caraviello DZ, Satter LD, Fricke PM, Wiltbank MC. 2005. Relationship between Level of Milk Production and Multiple Ovulations in Lactating Dairy Cows. J. Dairy Sci 88:2783–2793
- Pierson RA, Ginther OJ. 1984. Ultrasonography of the bovine ovary. Theriogenology 21:495-501.
- Pierson RA, Ginther OJ. 1987. Ultrasonographic appearance of the bovine uterus during the estrous cycle. JAVMA 190:995-1001.
- Quintella Arias L, Díaz de Pablo C, García Herrodon P, Peña Martínez A, Becerra Gonzalez J. 2006. Ecografía y reproducción en la Vaca. Editorial Universidad Santiago de la Compostela, España. p92.

- Roberts SJ. 1971. Veterinary obstetrics and genital diseases (Theriogenology). 2nd ed. Ann Arbor, Mich: Edwards Brothers Inc. 421–435.
- Sheldon M, Lewis GS, LeBlanc S, Gilbert RO. 2006. Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology* 65:1516–30.



Figura 1. a) Lugar del trabajo acondicionado para que haya baja luminosidad; b) equipo ultraportátil que tienen alimentación propia por baterías.

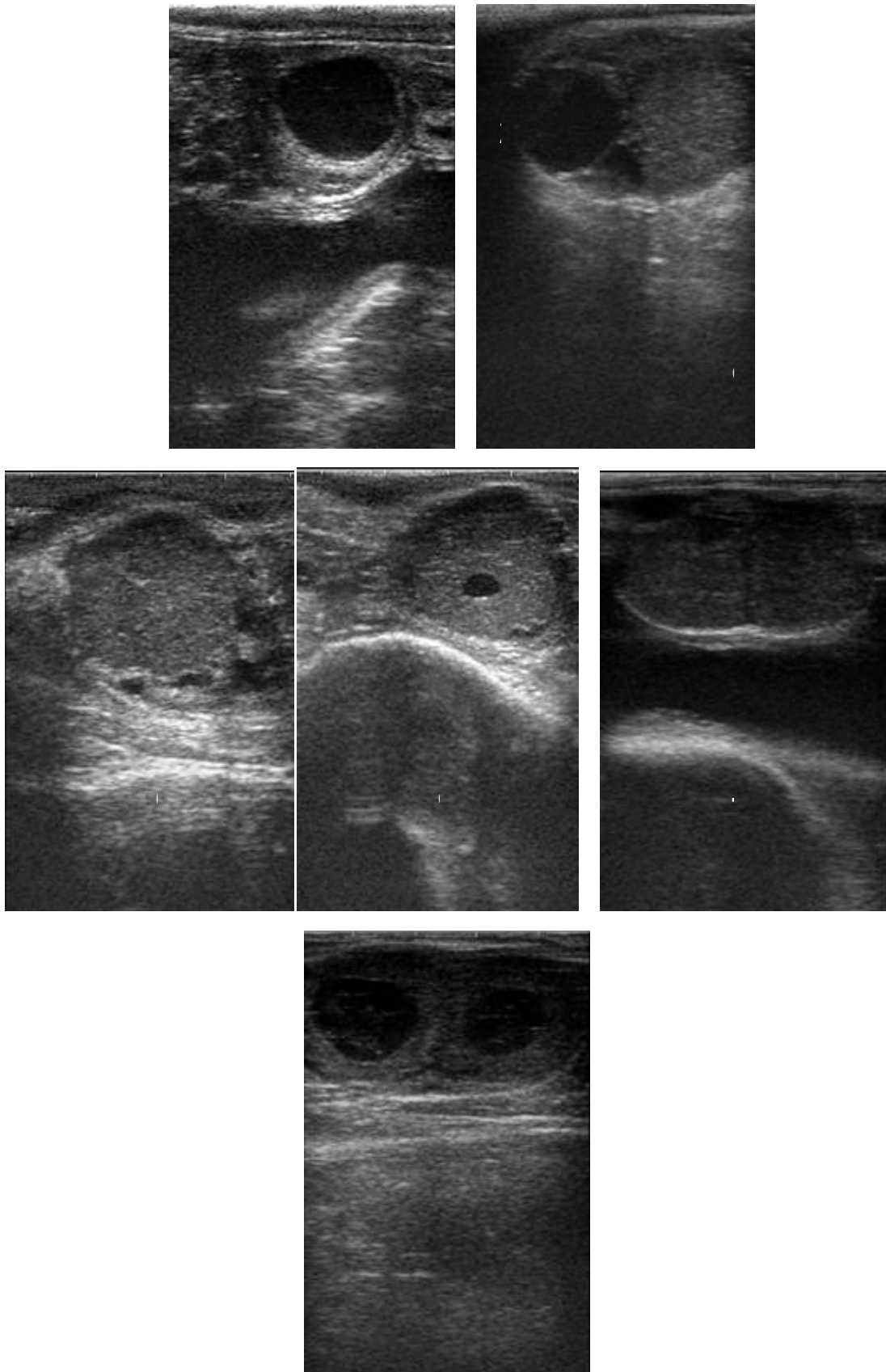


Figura 2. a) Folículo preovulatorio 15mm, b) se visualiza folículo (1) y un cuerpo lúteo (2), c) cuerpo lúteo, d) cuerpo lúteo con cavidad, e) doble cuerpo lúteo, f) doble cuerpo lúteo con cavidad.

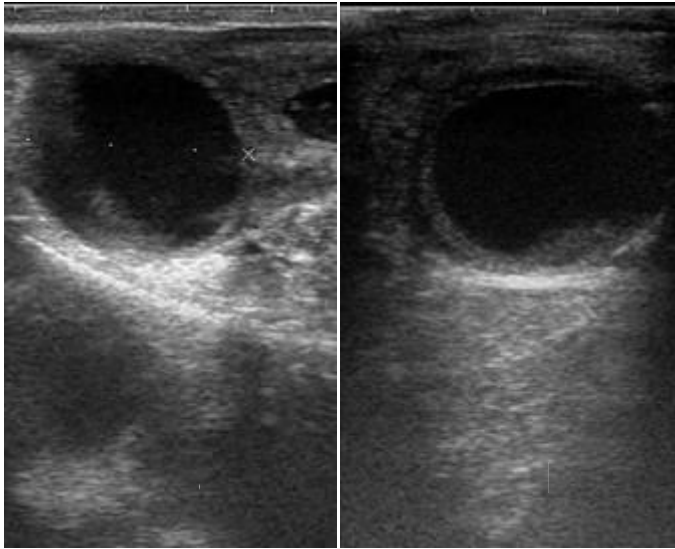


Figura 3. a) quiste folicular de 25mm, (b) quiste luteal donde se puede observar una pared luteinizada de 2 mm de espesor.

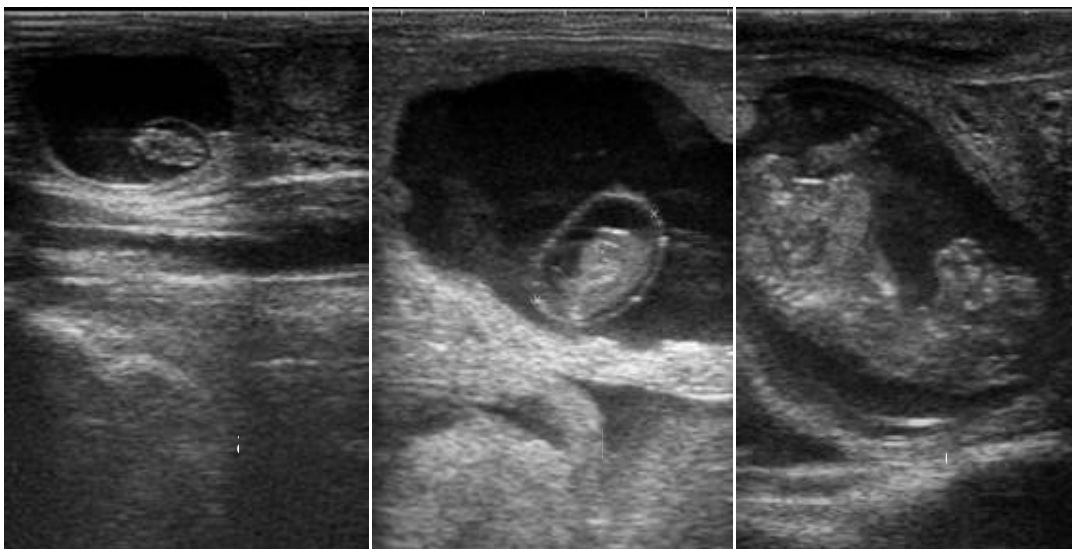


Figura 4. a) gestación 30 días, b) gestación 40 días, C) gestación 54 días donde se comienza a visualizar los núcleos de osificación hiperecogénicos.

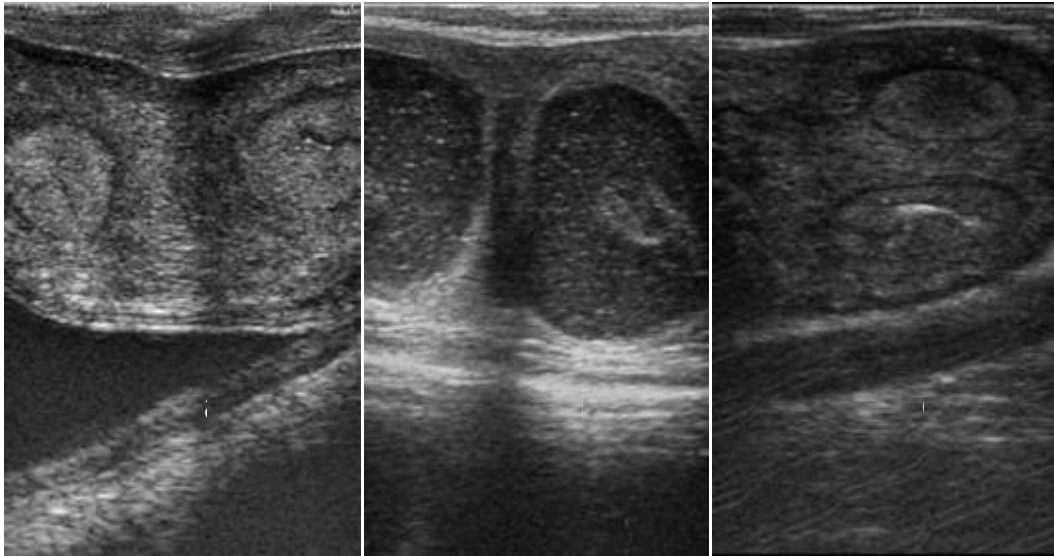


Figura 5. a) corte transversal de un útero vacío normal. (b) corte transversal de un útero con piómetra. (c) corte transversal de útero con una colecta de menor tamaño que podría corresponder a una endometritis.

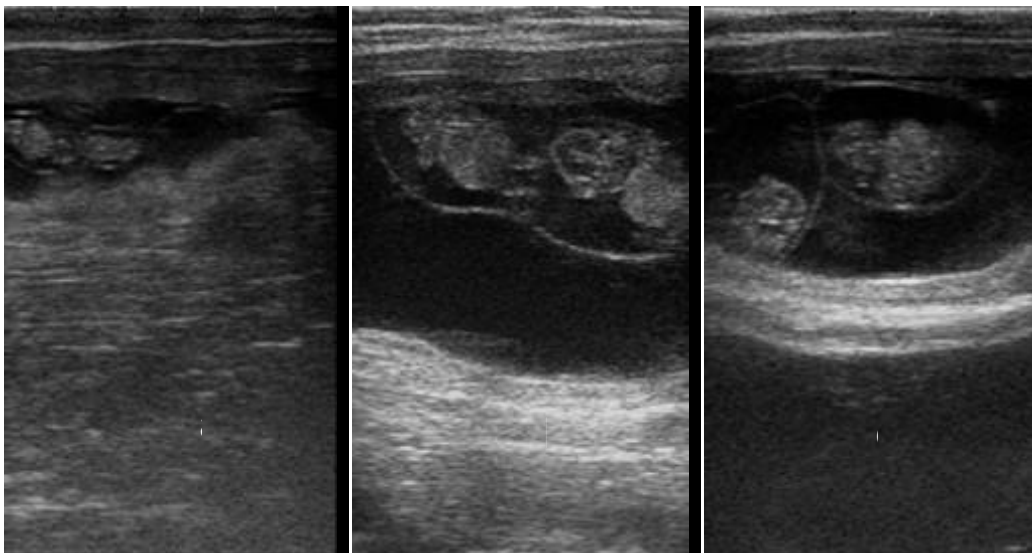


Figura 6. a) gestación doble de 33 días, (b y c) gestación doble de 40 días.

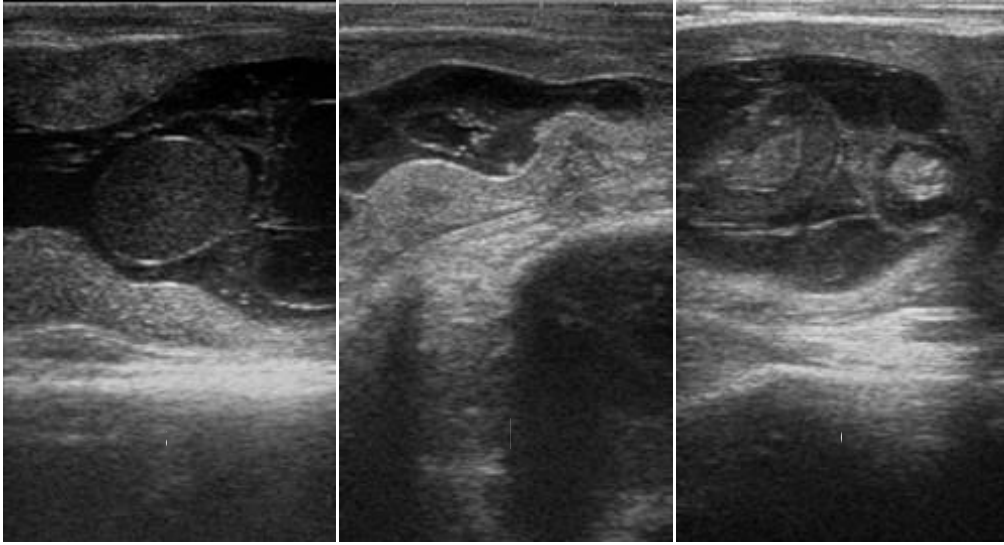


Figura 7. a) se visualiza edema en el endometrio además se visualiza la vesícula con líquido ecogénico en su interior. (b) se observan restos de vesícula y de membranas. (c) se visualiza una gestación doble, donde nos encontramos con dos vesículas disminuidas de tamaño y con líquido ecogénico en su interior.

SECCIÓN V

Ovinos



CAPÍTULO 50

Exploración ultrasonográfica del aparato genital de la oveja y de la cabra

Andrés Telésforo Soto, María Verano Gómez

El advenimiento del uso de la ultrasonografía en los pequeños rumiantes permitió realizar un diagnóstico precoz, práctico y no invasivo de la gestación. Además, posibilitó el diagnóstico de diferentes patologías reproductivas tanto en el estado de vacuidad como gestacional de la hembra, así como el estudio de diferentes aspectos de la fisiología reproductiva de estas especies.

Generalidades

Aplicaciones de la ultrasonografía reproductiva en las ovejas y cabras

La ultrasonografía es utilizada para las siguientes determinaciones y diagnósticos:

- Diagnóstico de gestación (preñez / vacuidad).
- Determinación de la edad de gestación.
- Determinación de la distribución de las gestaciones.
- Diagnóstico de gestaciones múltiples.
- Determinación de gestaciones de “robo” (fuera del período del servicio).
- Determinación de la vitalidad fetal.

- Determinación del sexo fetal.
- Diagnóstico de patologías del aparato reproductor.
- Diagnóstico de patologías de la gestación.
- Estudio de la fisiología reproductiva (dinámica folicular y puerperio).
- Evaluación de la respuesta ovárica a un tratamiento superovulatorio.
- Estudio del crecimiento y desarrollo fetal y placentario.

Ventajas y beneficios del uso de la ultrasonografía en pequeños rumiantes

La aplicación de la técnica ultrasonográfica en las hembras representa una serie de ventajas y beneficios frente a otros métodos de diagnóstico de gestación, los cuales son:

- La determinación de la gestación es precoz y a tiempo real (visualización del conceptus).
- En los sistemas de producción cuyo objetivo es de 1,5 partos/año, su uso es esencial para poder organizar los servicios de los diferentes grupos.
- Al poderse comprobar la vitalidad del embrión o del feto, el resultado se expresa como *“% de preñez viable”*.
- Los componentes de una gestación (útero –pared y luz uterina -, embrión, vesícula embrionaria, feto o partes fetales, placentomas) son mensurables, por lo cual se logra estimar la edad gestacional, pudiendo establecer la distribución de las gestaciones para el período de servicio y permite el hallazgo de las preñeces ocurridas fuera del período del servicio (preñez de robo).
- Al poder identificarse el número de embriones o fetos (gestaciones múltiples) se podrá brindar a las madres una alimentación diferencial y adecuada a ésta circunstancia.
- Permite el diagnóstico de patologías del aparato reproductivo de la hembra durante la vacuidad o la gestación, por lo cual se podrá implementar una terapéutica en aquellos casos que lo justifique (costo/beneficio).
- El tipo y cantidad de patologías podrá ser un dato orientador hacia alguna problemática reproductiva.

El diagnóstico ultrasonográfico aporta al manejo reproductivo y alimenticio los siguientes beneficios:

- En los servicios de corta duración y al comienzo de la etapa reproductiva, brinda la posibilidad, frente a resultados adversos, de volver a dar servicios.

- Brinda la posibilidad de sincronizar a las hembras vacías normales, creando un nuevo grupo de parición.
- Se podrá reducir el riesgo de toxemia de la preñez en la población susceptible (gestaciones múltiples), brindándole una alimentación adecuada a las circunstancias.
- La realización del diagnóstico de gestación, independientemente de la técnica y especialmente si es precoz, permite eliminar los animales vacíos con anterioridad al momento tradicional (señalada). Este hecho conlleva a una mayor eficiencia en el uso de los recursos forrajeros por el ahorro significativo en materia seca.
- De realizarse un monitoreo (muestreo) de gestación en la majada o hato caprino, si bien perdemos el gran beneficio de ser más eficientes con los recursos forrajeros, nos permitirá valorar lo sucedido durante el período servicio/gestación (hasta el momento de la determinación).
- El contar con el dato del % de preñez, y de tomarse el % de parición, se podrá estimar el porcentual de abortos.

Técnica de exploración

Vías de Exploración

De acuerdo a la zona de aplicación del transductor existen tres vías para la exploración del aparato genital de las hembras de los pequeños rumiantes. Cada una de ellas posee sus respectivas indicaciones, ventajas e inconvenientes. La exploración se puede realizar desde el abdomen (*transcutánea o abdominal*); introduciendo el transductor por vía rectal (*transrectal*), o bien por vagina (*endovaginal*). Las diferentes vías de exploración pueden ser usadas indistintamente en ambas especies (Kähn, W. 1994).

El uso de una determinada vía dependerá del trabajo y diagnóstico a realizar, del tipo de sonda que se posee y también de las condiciones durante el examen (instalaciones, personal, temperamento animal, entre otros). Para el diagnóstico de gestación antes del día 35 de preñez, el examen por vía transrectal es más preciso que la vía transcutánea o abdominal. Entre los días 35 y 70 de gestación ambas vías de exploración aparecen con equidad. La vía abdominal es de elección a partir de la segunda mitad de la gestación, ya que se visualiza una gran porción del útero preñado. Sin embargo, en los rodeos con servicio estacionado con una duración de 45 a 60 días, en los cuales el diagnóstico se lleva a cabo entre los 25 y 45 días de culminado el servicio, la vía de elección es la abdominal, y en caso de la existencia de dudas diagnósticas, se realiza el examen transrectal (Kähn, W. 1994; Soto, AT y col 2004).

Vía Transcutánea o abdominal

La ultrasonografía transcutánea puede ser realizada con el animal de pie, sentado o de decúbito. Se obtiene una mayor velocidad en el trabajo realizando la exploración con el animal de pie. El examen debe realizarse sobre el lado derecho del animal, ya que en la mayoría de los casos el rumen desplaza el útero preñado hacia la derecha donde encuentra espacio relativo. La ultrasonografía abdominal, cuando es realizada con el animal de pie, se facilita si se levanta el miembro posterior derecho. En la preparación de los animales es recomendable remover el alimento 12 hs previo al diagnóstico (Fowler, D.G. and Wilkins, J.F, 1985; Kaulfuss, K.H. y col.. 1999; Soto, A.T. y col. 2004).

El transductor se aplica en un área carente de lana o pelo, inmediatamente por delante y a lateral de la ubre, craneal a la glándula sebácea inguinal. Para que haya un buen contacto del transductor con la piel se debe interponer gel para que no exista aire entre ambas superficies. El transductor deberá ser dirigido hacia la vejiga urinaria (anecogénica). Desde este punto no se encuentra mayor inconveniente en diagnosticar preñez/vacuidad. Ambos lados del abdomen deberían ser explorados ya que en ocasiones se observa el útero preñado del lado izquierdo (Fowler, D.G. and Wilkins, J.F, 1985; Kaulfuss, K.H. y col. 1999; Soto, A.T. y col. 2004).

El número de ovejas que se pueden explorar en un período de tiempo por esta vía dependerá de la experiencia del operador, de la cantidad y velocidad de trabajo de los colaboradores, de la categoría animal, de la edad predominante de la preñez en la majada o hato, el tipo de diagnóstico y las condiciones de trabajo. De acuerdo a estas variables, y donde el propósito del examen sea meramente distinguir entre preñadas y vacías, el tiempo de diagnóstico variará de 30 segundos a 1 minuto por animal. Si debe ser determinado el número de fetos, el tiempo medio de duración del examen por animal puede ser de 2 minutos o mayor (Kähn, W. 1994; Soto, A.T. y col. 2004).

Vía Transrectal

La vía transrectal es esencialmente utilizada en el diagnóstico precoz de la preñez y también en la determinación de las diferentes estructuras ováricas.

Antes de realizar un examen ultrasonográfico transrectal, se deberá proceder a tener una buena sujeción del animal. Preferentemente, se indica retirar las heces del recto, aunque no es necesariamente indispensable. Ocasionalmente, las heces suelen interponerse entre el transductor y la pared del recto llegando a entorpecer la lectura de la imagen. Cuando el cable de la sonda es flexible puede incorporarse un implemento de sostén al transductor y al cable para darle mayor rigidez y poder manipularlo intrarectalmente. Un requisito indispensable para

el uso de la ultrasonografía transrectal es la posibilidad de introducir el transductor en el recto y que su superficie de escaneo pueda ser rotada ventral y lateralmente. Es aconsejable el uso de gel para introducir el transductor (Kähn, W. 1994; Kaspar, B. 1989; Pieterse, M.C. 1999)

Una vez que se introdujo el transductor en el recto, mediante movimientos de rotación, debe ser llevado hacia craneal hasta ubicar la vejiga urinaria. Una vez identificada, se avanzará lentamente mientras se lo mueve lateralmente 45° en ambas direcciones hasta la visualización del útero. El tiempo de exploración es comparativamente algo mayor con respecto a la transcutánea, pudiéndose esperar un tiempo de 30" hasta 2 minutos/animal (Kähn, W. 1994).

Vía endovaginal

La utilización de la vía endovaginal es infrecuente en la práctica cotidiana. Esencialmente, podrá ser utilizada en el diagnóstico de estructuras y hallazgos ováricos, principalmente dirigida a realizar estudios sobre la dinámica folicular.

Inspección ultrasonográfica del tracto genital femenino

Ovarios

El estudio ultrasonográfico de los ovarios en las ovejas y cabras se realiza por vía endovaginal o transrectal mediante el uso de una sonda cuya frecuencia sea de 7.5 MHz o mayor ya que permite una mayor definición de las diversas estructuras ováricas. Sin embargo, pueden ser apreciadas, sin mayor dificultad, utilizando una frecuencia de 5 MHz (Kaulfuss, K.H.1998).

La probabilidad de identificar uno o ambos ovarios depende de la presencia de estructuras ováricas, principalmente de los folículos ováricos por el contraste que generan. La identificación de los ovarios se realiza con mayor facilidad cuando se presentan folículos dominantes (5 a 8 mm de diámetro). Los folículos se caracterizan por ser una estructura circular y anecoica debido a la presencia de un fluido puro en su antrum (Fotos 1 y 2). Los folículos luteinizados se caracterizan por ser semejantes a los folículos ováricos pero se diferencian en que la pared folicular se encuentra engrosada con una ecogenicidad similar al cuerpo lúteo (Bartlewski, P.M. y col. 2000; Basaran, D.A. 1999; Kaulfuss, K.H.1998; Slóssarz, P. 1999; Soto, AT y col 2004).

El cuerpo lúteo produce reflexión típica de baja densidad (ecogénico) debido al tejido luteal y su diámetro medio es de unos 10 mm (Foto 3). Su identificación es más sencilla a medida que madura, siendo el momento óptimo para su observación entre los días 7-10 del ciclo estral. Una cavidad de pocos milímetros puede observarse en el centro de muchos de ellos, *cuerpo*

lúteo cavitario, siendo su contenido anecoico (Dickie, A.M. y col.1997; Kaulfuss, K.H. y col. 1996; 1997; Soto, AT y col 2004).

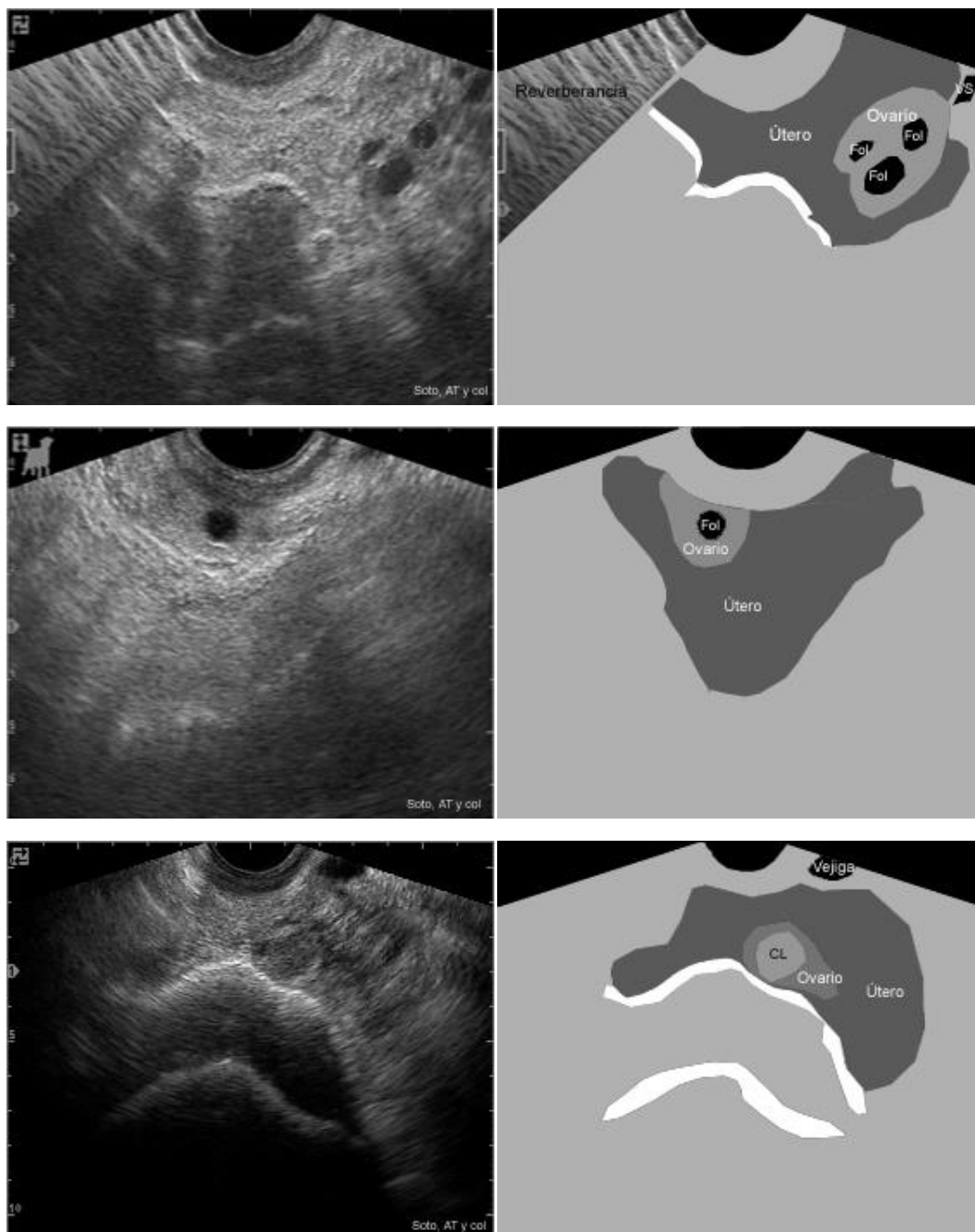
Útero

Los hallazgos, tanto en úteros vacíos como gestantes, son similares en la oveja y en la cabra (Tainturier et al 1983 a y b)

Útero vacío

Para obtener una mayor seguridad en el diagnóstico, se debe llevar a cabo un examen sistemático. Primero se debe ubicar la vejiga urinaria la cual es de fácil reconocimiento por su luz anecoica y forma típica. El útero vacío aparece en la cavidad pelviana, cercano al área del apex de la vejiga. Los cuernos uterinos vacíos se encuentran usualmente cráneo-ventralmente, algunas veces lateralmente de la vejiga urinaria. El útero preñado puede ser encontrado en la cercanía del apex de la vejiga y a medida que avanza la edad de gestación se expandirá en dirección craneal (Buckrell, B.C. y col. 1986; 1988)

Durante la inspección transrectal, si el transductor es colocado dorsalmente sobre el útero se produce una sección sagital, directamente ventral y paralelo al eje longitudinal del cuerpo. Una sección de la pared uterina produce una ecogenicidad homogénea y granular (Fotos 1, 2 y 3). Normalmente, no son detectados líquidos en el útero y dependiendo del equipo utilizado se puede llegar a detectar una pequeña luz intrauterina durante el estro (Buckrell, B.C. y col. 1986; 1988). Solamente, durante el proestro y el estro de animales superovulados se detecta intrauterinamente, en forma constante, regular contenido de líquido (Basaran, D. y col.1998; Dickie, A.M. y col. 1997; González de Bulnes, y col. 1999).

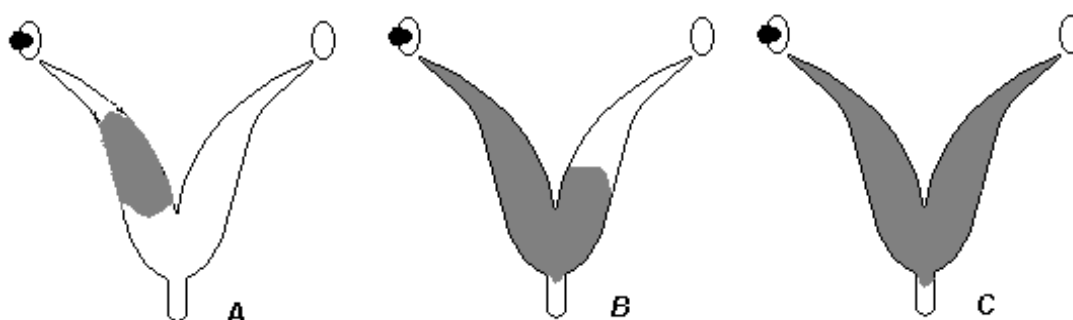


Fotos 1, 2 y 3: Imágenes ultrasonográficas (izquierda) y gráficos (derecha) correspondientes a úteros normales, ovarios, cuerpo lúteo (CL) y folículos ováricos (Fol)

Útero Gestante

1) Período menor a 20 días

El trofoblasto de la oveja y la cabra comienza a elongarse considerablemente a partir del día 11 de preñez. Para el día 13/14 las membranas embrionarias son un tubo longitudinal de 10 cm en el cuerno uterino ipsilateral al cuerpo lúteo de la preñez. Alrededor del día 16/18 se extienden al cuerno contralateral. En el día 20 las membranas embrionarias se extienden hasta el extremo del cuerno uterino contralateral (King, G.J. y col.1982) (Figura 1)



A partir del día 11 e la preñez, comienza a elongarse considerablemente el trofoblasto de la oveja y la cabra. Para el día 13/14 las membranas embrionarias poseen un largo de 10 cm en el cuerno ipsilateral al cuerpo lúteo de la preñez (A). Alrededor del día 16/18 se extienden al cuerno contralateral (B), llegando al extremo del cuerno uterino contralateral para el día 20 de gestación (C).

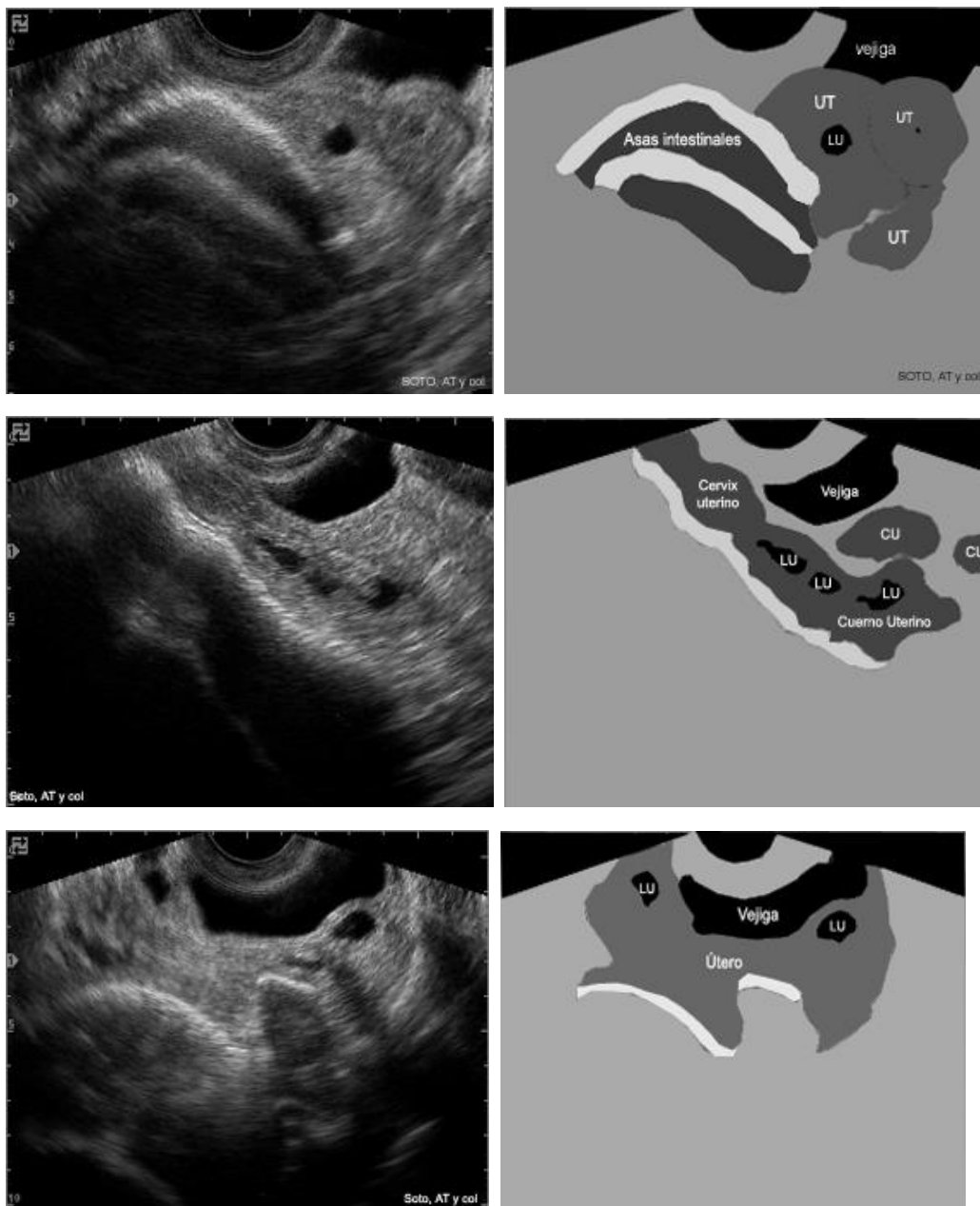
Figura 1: Representación esquemática del desarrollo de las membranas embrionarias entre los días 13 y 20 de una gestación (Soto, A.T. 2004)

Por vía transrectal, entre los días 13 y 21 de la gestación de la oveja ($x=18\pm2$ días), ocasionalmente se halla la visualización de una sección anecoica no mayor a 4 mm. Durante este período, la demostración de una luz anecoica es presumible de una preñez pero no puede ser usado como tal ya que hay ausencia de los signos indicativos de una gestación (vesícula amniótica, embrión/feto, placentomas). Los depósitos de pequeñas cantidades de líquido en el útero pueden también tener otro origen en otras causas que la preñez, tales como el proestro y estro o bien patologías como la hidrómetra. Sin embargo, entre los días 17 y 19 de gestación se puede visualizar en dorsal y ventral de la interfase de la vesícula amniótica y la pared uterina una imagen especular. (Basaran, D. et al 1998; Buckrell, B.C. y col. 1986; 1988; Dickie, A.M. y col. 1997; García, A. y col. 1993; González de Bulnes, y col. 1999; Kaulfuss, K.H.1996; Mailot, J.P. y col. 1995; Pieterse, M.C. and Taverne, M.A.M. 1986; Soto, A. T. y col 2004; Zorrouk, A. 2000)

Antes del día 20, la ultrasonografía no constituye una medida práctica de realización diagnóstica de la preñez. En la mayoría de los casos debe considerarse como una preñez dudosa, sin la presentación de signos positivos de la gestación, por lo tanto a este período se lo define como **asintomático** (Fotos 4, 5 y 6) (Buckrell, B.C. y col.1986; 1988; Kaulfuss, K.H.1996).

2) Período del día 20 al 40 de preñez

Entre los días 20-25 de gestación se puede observar el útero como una serie de vesículas conteniendo líquido embrionario. Usualmente, se hallan inmediatamente a craneal o craneo-ventral de la vejiga urinaria. La imagen consiste en áreas anecóicas de apariencia separada. Esta imagen multilacunar, con diferentes zonas anecóicas en el útero se encuentra tanto en preñeces simples y múltiples (Fotos 8, 12, 15, 19, 20, 21). El aumento del diámetro de las secciones transversales se incrementa de 10 mm al día 20 a 15 mm en el día 25, y 20 mm al día 30 (Blasco, I. y col.1989; Buckrell, B.C. y col.1986; 1988; Kaulfuss, K.H. 1996).



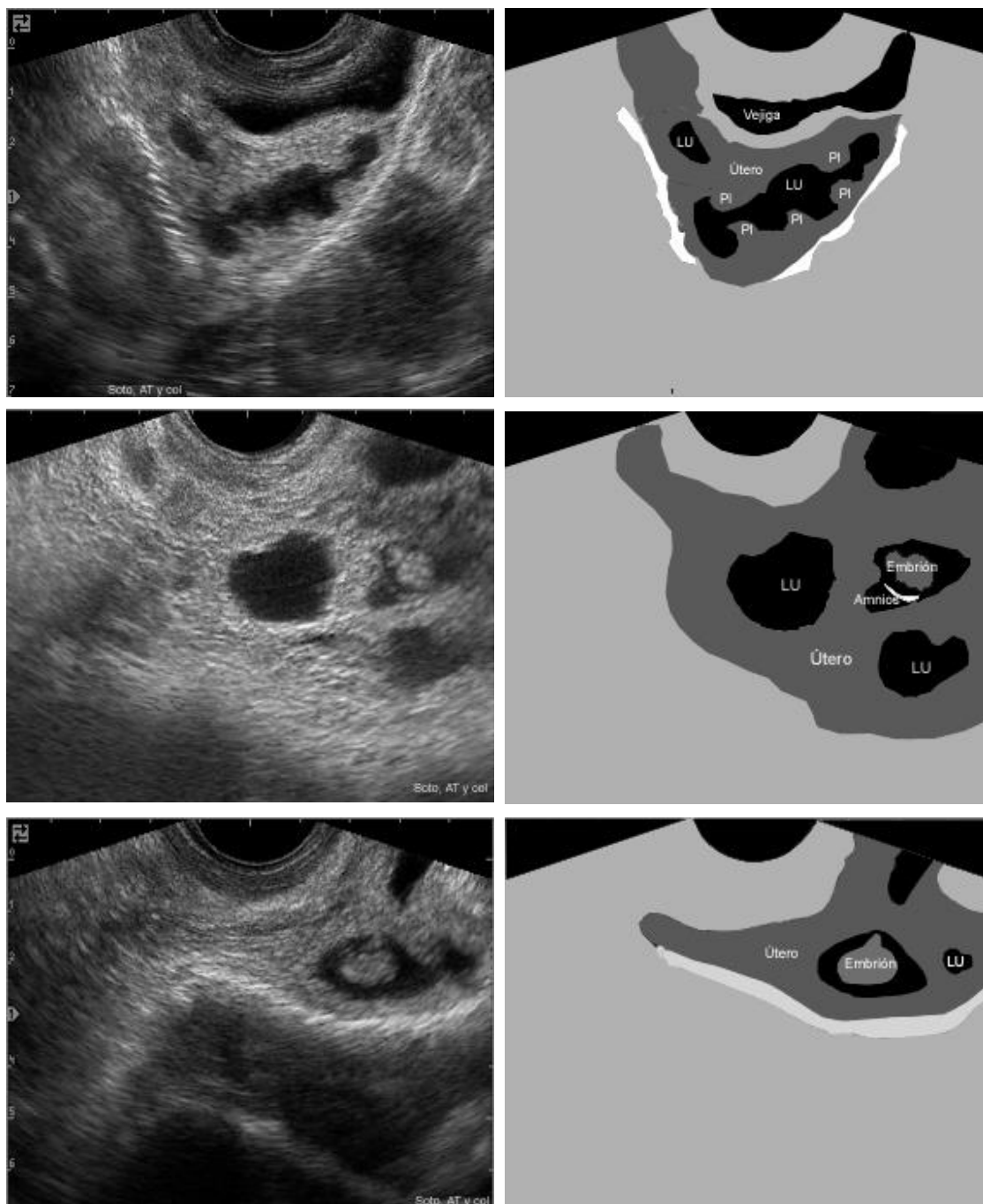
Fotos 4, 5 y 6: Imágenes ultrasonográficas (izquierda) y gráficos (derecha) correspondientes a gestaciones de 21 días a 23 días. En todas ellas se puede observar la presencia de líquidos en el interior del útero (luz uterina) y la ausencia de estructuras indicativas propias de una gestación (período asintomático). LU: luz uterina; UT: útero.

Los primeros embriones pueden apreciarse entre los días 17 y 28 de preñez. Durante este período, los embriones yacerán muy cerrados y cercanos a la pared uterina (Fotos 8, 9 y 10). Se deberá tener sumo cuidado en diferenciar entre los placentomas y los embriones. Los primeros placentomas comienzan a visualizarse sobre la pared uterina aproximadamente entre los días 23 y 33 de la gestación (Foto 7). En este período, aparecen como un botón protruido de unos escasos milímetros. Sin embargo, son claramente más pequeños que los embriones (Buckrell, B.C. y col.1986; 1988; García, A. y col.1993; Kaspar 1988).

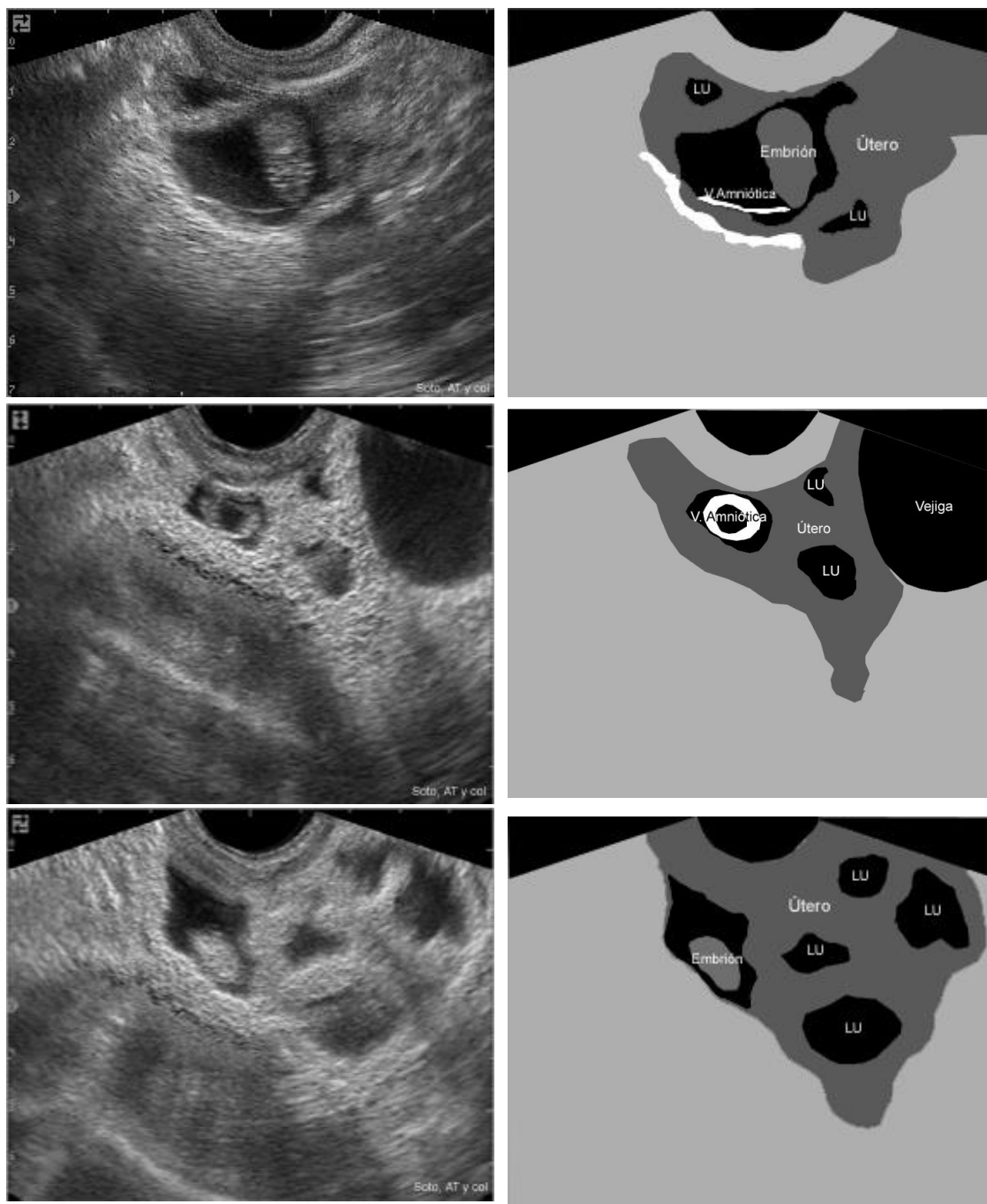
El amnios puede ser visto por primera vez entre el día 25/30 (Fotos 8, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20 y 21). Forma una línea hiperecoica la cual encapsula al embrión a una distancia de 1 a 2 milímetros (Kaulfuss, K.H. 1996).

La vía transrectal es más confiable que la vía transcutánea para el diagnóstico de gestación antes del día 35. A partir de esta edad gestacional, ambas vías son válidas para el diagnóstico de preñez (Blasco, I. y col.; Buckrell, B.C. y col. 1986; 1988 1989; Kaulfuss, K.H. 1996)

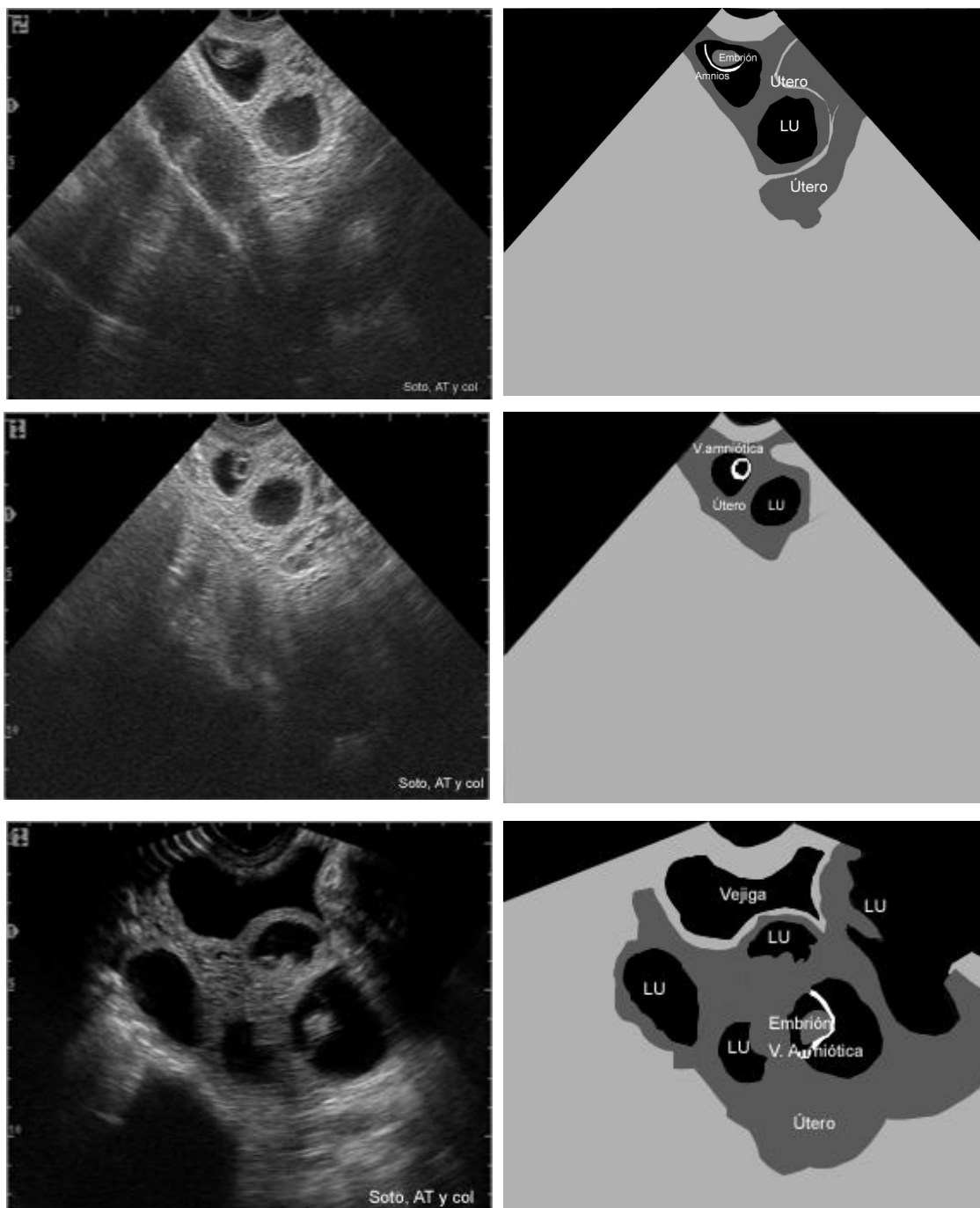
Para el diagnóstico de gestaciones múltiples se deberá tener en cuenta la posibilidad de diferenciar los embriones por separado o la duplicación de las partes fetales. La posibilidad de contar el número de embriones, diferirá en parte con el número presente. Así, la visualización de un embrión ocurre entre el día 18 al 26, las gestaciones dobles entre el día 19 al 32 y en los trillizos es posible su conteo entre los días 24 al 32 (Fotos 19, 20 y 21) (Fowler, D.G. and Wilkins 1984; Kaulfuss, K.H. 1996).



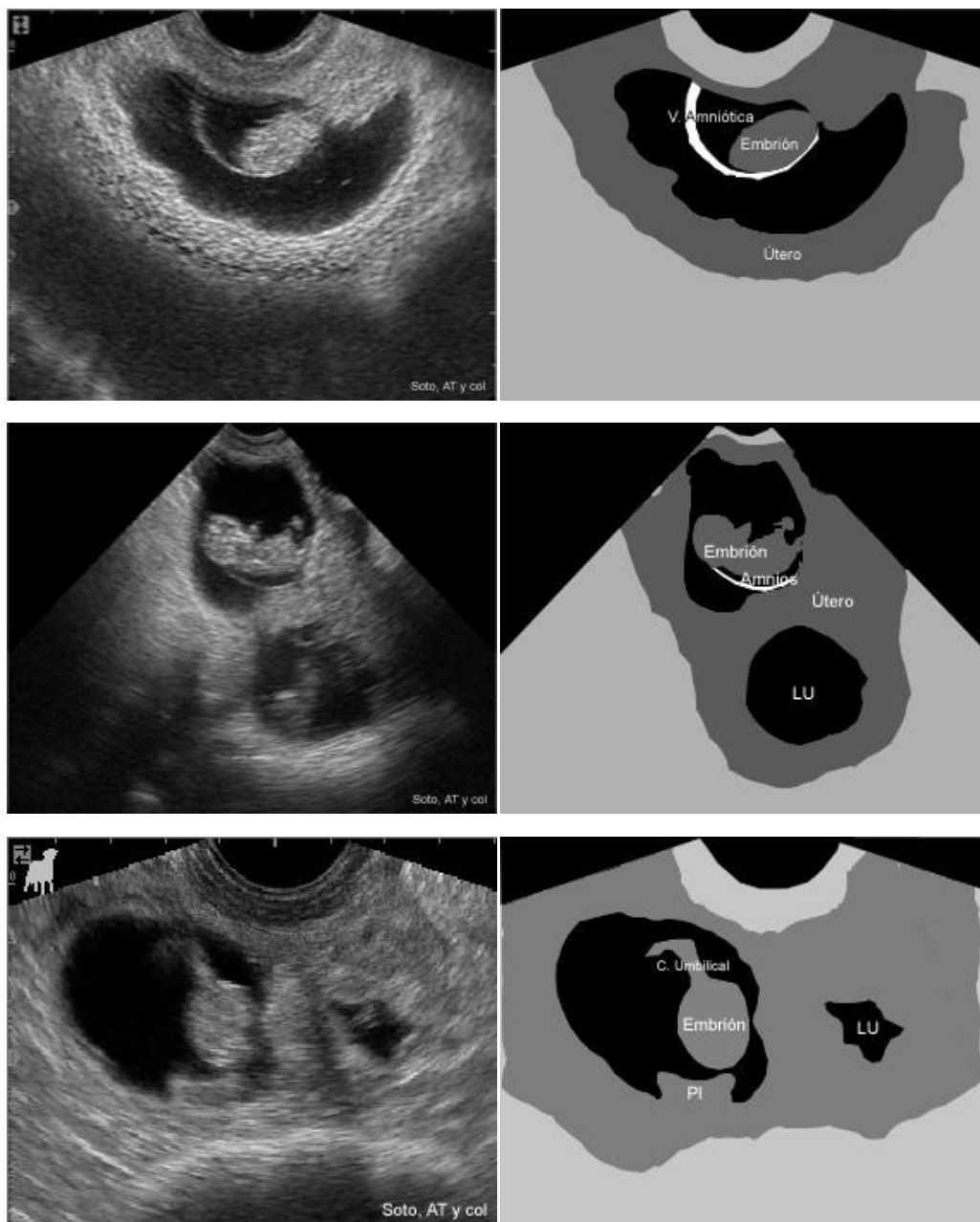
Fotos 7, 8 y 9: Imágenes ultrasonográficas (izquierda) y gráficos (derecha) correspondientes a gestaciones de 25/26 días. En todas ellas se pueden observar la presencia de signos indicativos de la gestación (embrión, vesícula amniótica y placentomas). LU: luz uterina; PI: placentomas.



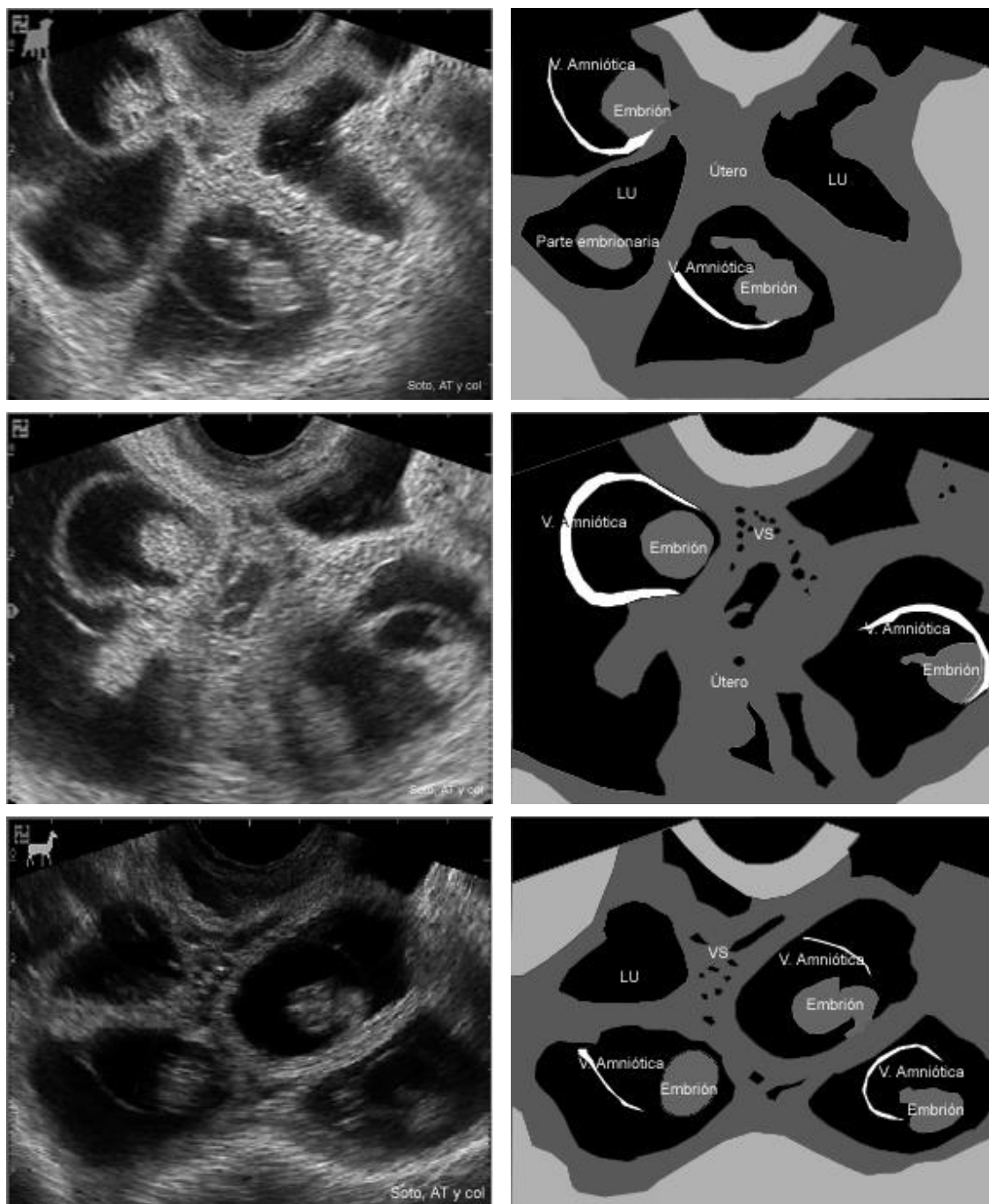
Fotos 10, 11 y 12: Imágenes ultrasonográficas (izquierda) y gráficos (derecha) correspondientes a gestaciones de 27 a 30 días. En todas ellas se pueden observar la presencia de signos indicativos de la gestación (embrión y vesícula amniótica y placentomas). LU: luz uterina .



Fotos 13, 14 y 15: Imágenes ultrasonográficas (izquierda) y gráficos (derecha) correspondientes a gestaciones de 30 a 34 días. En todas ellas se pueden observar la presencia de signos indicativos de la gestación (embrión y vesícula amniótica). LU: luz uterina).



Fotos 16, 17 y 18: Imágenes ultrasonográficas (izquierda) y gráficos (derecha) correspondientes a gestaciones de 35 a 40 días. En todas ellas se pueden observar la presencia de signos indicativos de la gestación (embrión y vesícula amniótica y placentomas). LU: luz uterina; PI: placentoma.



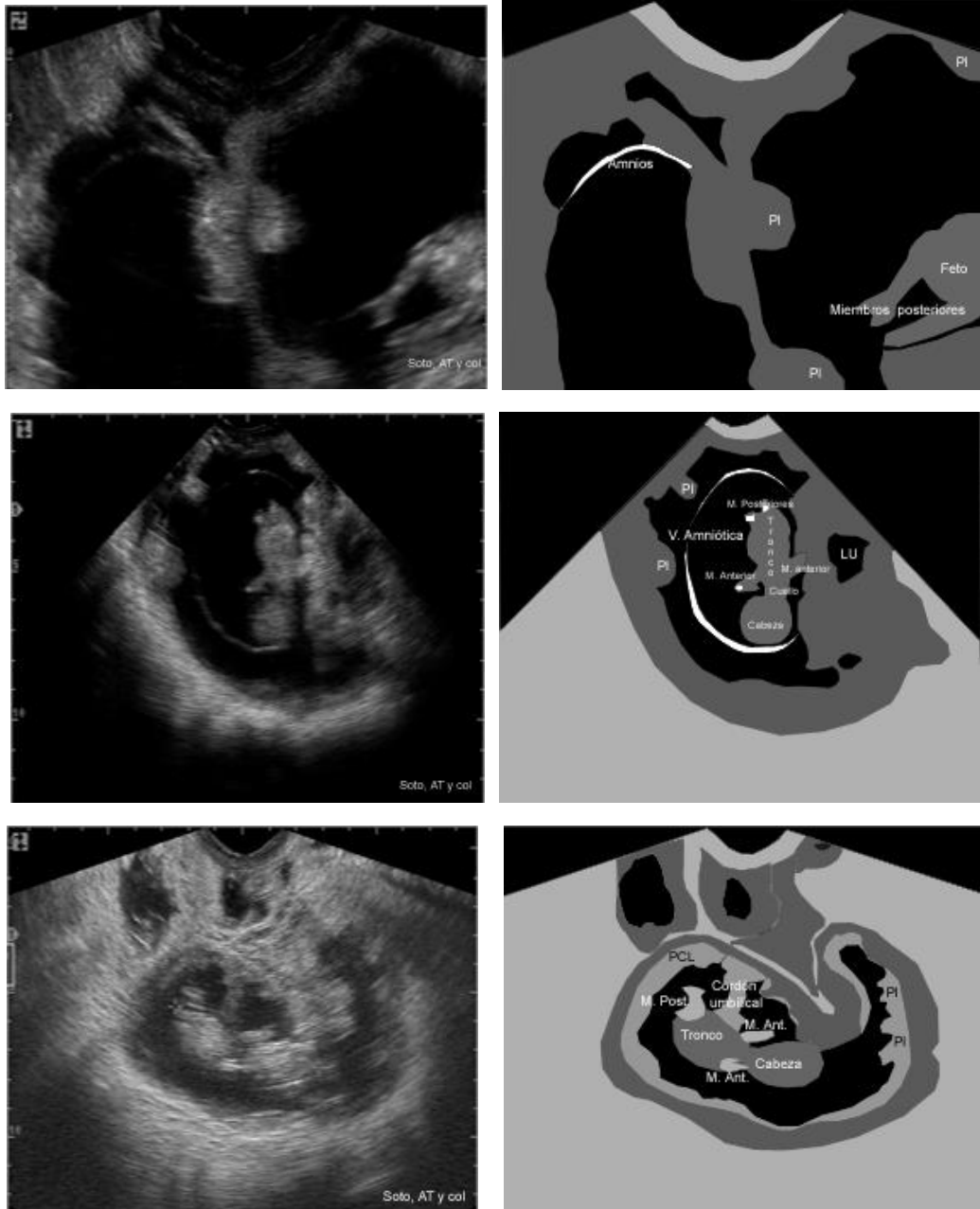
Fotos 19, 20 y 21: Imágenes ultrasonográficas (izquierda) y gráficos (derecha) correspondientes a gestaciones múltiples. En todas ellas se pueden observar la presencia de signos indicativos de la gestación (embrión y vesícula amniótica). LU: luz uterina; VS: vasos sanguíneos.

3) Período del día 40 al 100 de gestación

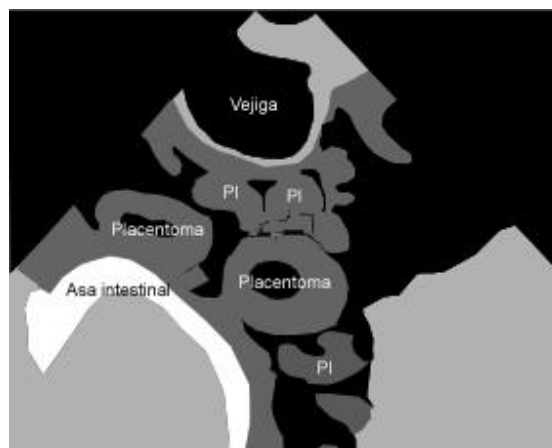
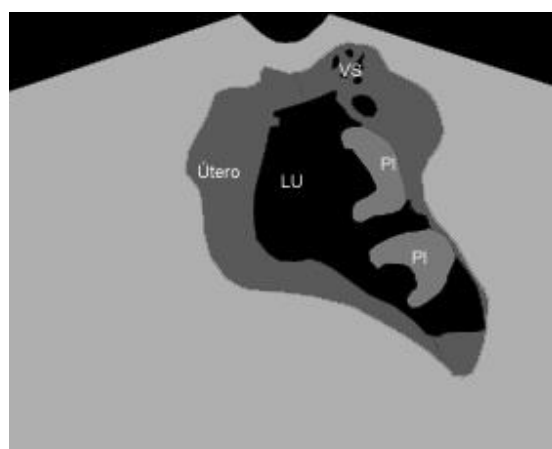
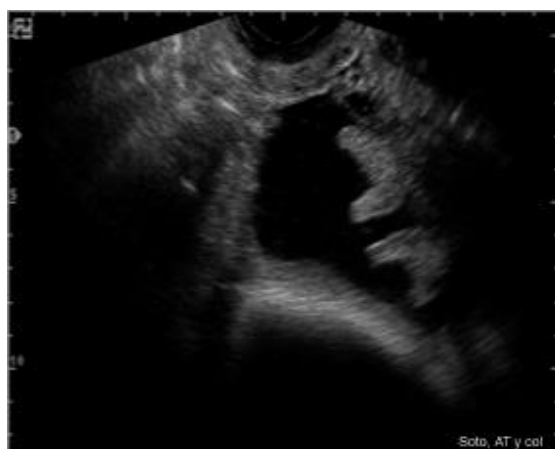
Los fetos, de estructura ecoica, están rodeados por grandes cantidades de líquido hipoecoico o anecoico durante este período. De ser gestaciones múltiples, se encuentran bien separados uno de otro y pueden ser distinguidos entre ellos. Durante este período los fetos se agrandan rápidamente. El largo cráneo-caudal oscila de 4 a 5 cm. para el día 40, se incrementa a 7-8 cm para el día 50 y al día 60 poseen un largo aproximado de 10 cm (Evans and Sack 1973),

Durante el segundo y tercer trimestre de la preñez numerosos órganos de los fetos ovinos y caprinos pueden ser detectados por ecografía. La cavidad craneal y las órbitas, corazón, estómago, riñones y cordón umbilical pueden ser reconocidos con claridad (Fotos 18, 29, 30, 31, 32 y 33). Como resultado de su intensa ecogenicidad las partes óseas, como costillas, columna vertebral, vértebras y las extremidades, pueden identificarse sin dificultad (Fotos 22, 23, 24, 25, 29, 30, 31, 32, 33). (De Bois and Taverne 1984; Zipper, N. y col.1996).

La edad fetal puede ser estimada a través de la medición de diferentes partes fetales y en el caso de saber la fecha de servicio se puede confirmar si la gestación corresponde a dicha fecha servicio o bien asegurarse el status de desarrollo del conceptus. Más allá de otras medidas, el diámetro biparietal (DBP) (Foto 29), el largo del embrión/feto (largo craneo-caudal) (Foto 23 y 24) y el largo del fémur de los fetos ovinos y caprinos son particularmente estructuras de fácil hallazgo para una evaluación fetométrica. Sin embargo, la mensura del fémur posee dificultades ya que en ocasiones la imagen de un corte longitudinal no puede visualizarse por completo. Sobre una media, la medida del DBP es de 7,5 a 10 mm al día 40, 10 y 14 mm día 50, 15 y 20 mm al día 60, de 23 a 26 mm alrededor del día 70 y de 40-45 mm para el día 100 (Haibel and Perkins 1989; Haibel y col.1989; Kähn, W. 1994)



Fotos 22, 23 y 24: Imágenes ultrasonográficas (izquierda) y gráficos (derecha) correspondientes a gestaciones de 46 a 52 días. En todas ellas se pueden observar la presencia del feto, partes fetales y otros componentes de la gestación. LU: luz uterina. PCL: placenta; PI: placentoma. M. Ant: miembro anterior; M. Post: miembro posterior.



Fotos 25, 26 y 27: Imágenes ultrasonográficas (izquierda) y gráficos (derecha) correspondientes a gestaciones de 53 a 56 días (Fotos 25 y 26) y de aproximadamente 80 días (Foto 27). Se observa el predominio de los placentomas sobre otros componentes de la gestación. LU: luz uterina; PI: placentoma; vs: vasos sanguíneos

Durante la segunda mitad de la gestación, los placentomas, aparte de las partes fetales, dominan la imagen ultrasonográfica (Foto 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 y 32). Son frecuentemente el primer signo positivo de preñez que se evidencia durante el examen. La demostración de su presencia puede ser usada como un signo certero de preñez (Kaulfuss, K.H. y col.1998)

En los pequeños rumiantes los placentomas producen una imagen ecográfica característica. Inicialmente son aplanados y abotonados (Fotos 7, 18, 22, 23 y 24). A medida que progresa la preñez, la forma se hace anular con bordes prominentes y con una concavidad directamente dirigida hacia al feto. La forma de un placentoma desarrollado se asemeja a una palangana. Dependiendo del ángulo de sección obtendremos por ultrasonografía dos imágenes típicas de los placentomas. Un corte sagital a través de los placentomas resulta en un hemicírculo, de bordes apicales espesos, cóncavo y anecogénico – hipoecogénico hacia el plano interno. Los cortes de secciones horizontales producen imágenes en anillos caracterizándose por una zona periférica ecoica y un centro anecogénico – hipoecogénico (Fotos 25, 26, 27, 28, 29, 30 y 32). Si bien las ovejas poseen una cantidad diferente de placentomas que las cabras, la diferencia del número no es obvia ecográficamente. (Kaulfuss, K.H. y col. 1998).

El cálculo de la edad gestacional por medio del tamaño de los placentomas no es preciso, ya que estos pueden diferir de tamaño en las distintas porciones del útero gestante e inclusive dentro de una misma porción. También, debemos tener en cuenta a partir de los 70/90 días de gestación no existe mayor diferencia de tamaño entre los placentomas y tampoco para el tipo de gestación (simples o múltiples) y además existe variación en el tamaño para la categoría de hembra. Entre la edad gestacional y el tamaño de los placentomas existe una muy baja correlación, tomado por vía transrectal, para la categoría oveja. Para la categoría borrega, durante los días 30/90 de gestación, la determinación correcta de la edad fetal con un rango de ± 7 días está en el orden del 66% y cuando el margen de días a tomar es de ± 14 días es del 96%. Se concluye que la determinación de la edad gestacional por medio de la medición de los placentomas no tiene mayor validez cuando se requiere exactitud. Sin embargo, puede resultar de utilidad práctica para estimar una curva de distribución de la gestación de una majada (Doize, F y col. 1997; Kaulfuss, K.H. y col.1998; Soto y col. 2000; 2004).

4) Gestación entre 100 y 150 días

Durante este período, el escaneo de las partes fetales y el número de fetos son solamente posibles si los animales son examinados por vía abdominal, aunque puede ser dificultoso establecer realmente el número de fetos luego del día 100 de preñez. Los fetos durante este período son muy grandes y yacen uno al lado de otro, lo cual hace difícil distinguir entre ellos (Fotos 29, 30, 31, 32 y 33). La demostración de los placentomas es posible en todos los casos, por lo tanto la presencia de la preñez siempre puede ser diagnosticada (Fotos 28,29 y 32).

Durante el final del período gestacional, la medición del DBP no permite predecir el momento del parto, ya que la edad determinada por esta medida puede tener un error en más o en menos 15 días (Lacchini, R. et al. 2000).



Fotos 28, 29 y 30: Imágenes ultrasonográficas (izquierda) y gráficos (derecha). Cortes sagitales y horizontales de placentomas de una gestación ≥ 100 días (Foto 28). Imágenes correspondientes al cráneo, en la cual se podría tomar el DBP (Foto 29) y cabeza fetal donde se observa principalmente la órbita y la región frontonasal (Foto 30). PI: placentoma.



Fotos 31, 32 y 33: Imágenes ultrasonográficas (izquierda) y gráficos (derecha). Se observa partes óseas y órganos fetales: cavidad craneana (Foto 31), la columna vertebral (Fotos 31 y 33), costillas (Foto 32), riñón (Foto 33), corazón y estómagos (Foto 32). Pl: placentoma

Bibliografía

- Bartlewski, P.M.; Beard, A.P.; Rawlings, N.C. (2000) "Ultrasonographic study of ovarian function during early pregnancy and after parturition in the ewe" *Theriogenology* 53: 673-689.
- Basaran, D.A. (1999) "Akkeçilerde transrektal ultrasonografi yardimiyla ovulasyon orani, embriyonal vefötal gelismimin saptanmasi". *Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences* 23, 567-573.
- Basaran, D.A.; Aslan, S.; Dellal, G. (1998) "Ultrasonographic study of ovarian follicular dynamics in superovulated and nonsuperovulated White Goats". 49 th Annual Meeting of the European Association for Animal Production pp. 224.
- Blasco, I.; Folch, J.; Echegoyen, E. (1989) "Diagnóstico precoz de gestación y determinación del número de fetos por ecografía en ganado ovino." *ITEA* 82:22-31.
- Buckrell, B.C. (1988) "Applications of ultrasonography in reproduction in sheep and goats". *Theriogenology* 29:71-84.
- Buckrell, B.C.; Bonnett, B.N.; Johnson, W.H. (1986) "The use of real-time ultrasound rectally for early pregnancy diagnosis in sheep". *Theriogenology* 25:665-673.
- Coubrough, C.A.; Castell, M.C. (1998) "Fetal sex determination by ultrasonically locating the genital tubercle in ewes". *Theriogenology* 50:263-267.
- Curran, S.; Kastelic, J.P.; Ginther, O.J. (1989) Determining sex of the bovine fetus by ultrasonic assessment of the relative location of the genital tubercle. *Anim. Reprod. Sci.* 19: 217-227.
- Davey, C.G. (1986) "An evaluation of pregnancy testing in sheep using a real-time ultrasound scanner". *Aust. Vet. J.* 63:347-348.
- De Bois, C.H.W. and Taverne, M.A.M. (1984) "Drachtigheids-sonder-zoek bij het schaap. Twee-dimensionele echografie. Vlaams diergenesk. Tijdschr. 53:240-252.
- Dickie, A.M.; Paterson, C.; Anderson, J.M.L.; Boyd, J.S. (1997) "Determination of corpora lutea numbers in ewes using transrectal ultrasound" *Brithish Medical Ultrasound Society. Abstract Book.* Pp. 35.
- Doize, F.; Vaillancourt, D.; Carabin, H.; Belanger, D. (1997) "Determination of gestational-age in sheep and goats using transrectal ultrasonographic measurement of placentomes. *Theriogenology* 48:449-460.
- Evans, H.E. and Sack, W.O. (1973) "Prenatal development of domestic and laboratory mammals: growth curves, external features and selected references. *Zentbl. Vet. Med. Reihe C* 2: 11-45.
- Fowler, D.G. and Wilkins, J.F. (1984) "Diagnosis of pregnancy and number of foetuses in sheep by real-time ultrasonic imaging. I. Effects of number of foetuses, stage of gestation, operator and breed of ewe on accuracy of diagnosis." *Livestock Production Science* 11:437-450.
- García, A.; Neary, G.R.; Pierson, R.A. (1993) "Accuracy of ultrasonography in early pregnancy diagnosis in the ewe". *Theriogenology* 39: 847-861.

- González de Bulnes, A.; Osoro, K.; López Sebastián, A. (1999) "Ultrasonographic assessment of the ovarian response in eCG-treated goats" *Small Ruminant Research* 34:65-69.
- González de Bulnes, A.; Santiago Moreno, J.; López Sebastián, A. (1998) "Estimation of fetal development in Manchega dairy ewes by transrectal ultrasonographic measurements". *Small Ruminant Research* 27:243-250.
- Haibel, G.K. and Perkins, N.R. (1989) "Real-time ultrasonic biparietal diameter of second trimester Suffolk and Finn sheep fetuses and prediction of gestational age". *Theriogenology* 32:863-869.
- Haibel, G.K.; Perkins, N.R.; Lidl, G.M. (1989) "Breed differences in biparietal diameters of second trimester Toggenburg, Nubian and Angora goat fetuses". *Theriogenology* 32:827-834.
- Kaspar, B. "Ultraschalluntersuchung bei Ziegen: Eine zuverlässige methode zur Trächtigkeitsfeststellung. (1989) *Der Ziegenzüchter* 5:8-12.
- Kähn, W. (1994) *Veterinary Reproductive Ultrasonography*. Ed. Mosby – Wolfe, Germany.
- Kaulfuss, K.H.; Heylen, K.; Moritz, S.; Süß, R. 1996) "Differences in the corpus luteum morphology between German Mutton Merino ewes and heterozygous Booroola crosses". (49th Annual Meeting of the European Association for Animal Production, Varsovia. 4:211
- Kaulfuss, K.H.; Moritz, S.; Rösler, J. (1997) "Ovine corpus luteum morphology during early pregnancy" *Brithish Medical Ultrasound Society. Abstract Book*. Pp. 35..
- Kaulfuss, k.H.; Uhlich, K.; Brabant, S.; Blume, K.; Strittmatter. (1996) "Die ultrasonographische trächtigkeitsdiagnostik (B-Mode) beim schaf. Teil 1: Verlaufsuntersuchungen im ersten trächtigkeitsmonat". *Tierärztl Prax* 24: 443-52.
- Kaulfuss, k.H.; Uhlich, K.; Gille, U. (1998)"Ultrasonographische untersuchungen zum plazentomwachstum beimträchtigen schaf". *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 105162-167.
- Kaulfuss, K.H.; Süß, R.; Schenk, P. 1999 "Die ultrasonographische trächtigkeitsdiagnostik (B-Mode) beim schaf. Teil 4: Ergebnisse einer feldstudie in Deutschland". *Tierärztl Prax* 27 (G): 74-82
- King, G.J; Atkinson, B.A.; Robertson, H.A. (1982) "Implantation and early placentation in domestic ungulates. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 31: 17-30.
- Lacchini, R.; Boyesuk, D.; Matesanz, A; Soto, A.; Antonini, A. (2000) "Estimación del estadio gestacional en cabras criollas a través del diámetro biparietal determinado por ultrasonografía" 23º Congreso Argentino de Producción Animal. *Revista Argentina de Producción Animal* Vol. 20 – Sup. 1: 271-272.
- Pieterse, M.C. 1999. I Taller de Ultrasonografía: Aplicaciones en la reproducción bovina y ovina. Instituto de Teriogenología. Fc. Cs. Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.
- Pieterse, M.C. and Taverne, M.A.M. (1986) "Hydrometra in goats: Diagnosis with real-time ultrasound and treatment with prostaglandins or oxytocin". *Theriogenology* 26:813-821.
- Slóssarz, P.; Steppa, R.; Gadek, A. "Próba wykorzystania ultrasonografii transrektalnej do wczesnej diagnostyki ciąży u owiec".(1999) *Medycyna Wet.* 55 (10) 686-688.

- Soto, A.T.; Draghi, G.; Boyesuk, D.; Soni, C.; Nigro, H.; Cetra, B.; de La Sota, L.R (2000) "Efecto del control de la temperatura mediante el uso de media sombra sobre la distribución de la preñez de la majada" III Encuentro de Medicina de Pequeños Rumiantes del Cono Sur
- Soto A.T.; Gómez, M.V., de la Sota, R.L. (2004). "Fecundación, gestación y parto. Diagnóstico de la gestación". En Aisen, E. (ed.) *Reproducción ovina y caprina* (pp 115-131)., Buenos Aires, Argentina: Editorial Interamericana
- Taintuier, D.; Lijour, L.; Chaari, M.; Sardjana, K.W.; Denis, B. (1983) Diagnostic de la gestation chez la brebis par échotomographie. *Revue Méd. Vét.* 134:523-526.
- Zorrouk, A.; Drion, P.V.; Drame, E.D.; Beckers, J.F. (2000) "Pseudogestation chez la chèvre: facteur d'infécondité". *Ann. Méd. Vét.* 144:19-21.
- Zipper, N.; Kaulfuss, K.H.; May, J.; Elze, K. (1997) "Die ultrasonographische trächtigkeitsdiagnostik (B-Mode) beim schaf. Teil 3: Untersuchungen zur erfassung der anzahl von embryonen und feten." *Tierärztl Prax* 25:212-22.

CAPITULO 51

Pérdidas embrionarias y fetales en ovinos

*María Macarena Bruno-Galarraga, Marcela Isabel Cueto,
Alejandro Eduardo Gibbons, Jimena Fernánd, Isabel María
Lacau, Rodolfo Luzbel de la Sota.*

Generalidades

En los ovinos las pérdidas reproductivas pueden ser clasificadas según el momento de su ocurrencia en: fallas en la fertilización, muertes embrionarias y/o fetales, y muertes perinatales. Las pérdidas acontecidas durante la gestación se diferencian en mortalidad embrionaria y fetal, existiendo un mayor porcentaje de las mismas durante la etapa embrionaria (30% de los ovocitos liberados), siendo las muertes durante la etapa fetal generalmente inferiores (5-7%) (Edey, 1969, 1976; Berain, 1984; Wilkins y Croker, 1990). Como consecuencia de las pérdidas gestacionales se observa una reducción de las tasas de parición de la majada, que incrementará las pérdidas económicas para el sistema de producción ovina (Dixon y col., 2007). Cabe mencionar que la sobrevivencia embrionaria disminuye cuando la tasa de ovulación se incrementa, indicando que en preñeces múltiples el potencial de cría individual puede disminuir, sin verse afectado el porcentaje de parición total de la majada (Rhind y col, 1980; Schrick y Inskeep, 1993).

El mantenimiento de la preñez requiere de una serie de interacciones adecuadas entre el sistema materno de gestación y el desarrollo de los embriones, tanto el endometrio como el embrión sintetizan y secretan a la interfase embrio-maternal una miríada de factores de crecimiento, proteínas, citoquinas, hormonas y otras sustancias que actúan entre ambas partes para un correcto desarrollo y sobrevivencia de los embriones (Martal y col., 1997).

La mortalidad embrionaria se define como la pérdida del embrión entre la concepción y el fin del período embrionario de diferenciación (35-40 días de gestación). En este período, se puede producir la reabsorción completa del embrión sin observación de ningún signo clínico, salvo una extensión anormal del intervalo entre celos cuando la muerte del embrión se produce luego de la implantación. Contrariamente, las pérdidas fetales o abortos, se manifiestan por la momificación o expulsión prematura del feto no viable (Fernández Abella, 1993).

A continuación en el presente capítulo se desarrollan brevemente las principales causas y factores intervinientes en la presentación de la mortalidad embrionaria y fetal en el ovino.

Mortalidad embrionaria

La mortalidad embrionaria (ME) es una de las mayores causas de las fallas reproductivas en todos los animales domésticos (Diskin y Morris, 2008; Walsh y col., 2011). Se ha observado que entre un 25 y un 55% de todos los embriones mamíferos no continúan su desarrollo durante la etapa embrionaria (Niswender y Nett, 1994). En los ovinos, la mayor ME ocurre alrededor del momento de implantación uterina (día 9 a 15 de gestación), no manifestando alteraciones del ciclo estral (Hafez, 1996).

Las modificaciones del medio materno pueden interferir gravemente sobre el desarrollo futuro del embrión y jugar un papel determinante en la etiología de ciertas embriopatías.

La degeneración del cigoto representa la primera etapa de la ME, en la cual la división en blastómeros (futuro embrión) se presenta irregularmente. La ME en el curso de la organogénesis (formación de los órganos) sigue esta secuencia: reabsorción del líquido embrionario, descomposición del embrión y posteriormente de las membranas embrionarias. En los rumiantes, el embrión puede ser reabsorvido mientras que las membranas embrionarias y el cuerpo lúteo se mantienen, lo que determina anestros prolongados por imposibilidad de secreción de prostaglandina endometrial, hormona que desencadena la lisis del cuerpo lúteo.

Si el embrión muere al principio de la gestación, es generalmente absorbido y termina la gestación. En una poliovulación, al contrario, la muerte o la reabsorción de uno o más embriones no lleva necesariamente al fin de la gestación, ya que los fetos normales pueden llegar a término de la gestación.

Clasificación de las pérdidas embrionarias

Mortalidad embrionaria temprana: es la muerte del embrión previa al reconocimiento materno de la gestación (día 14 de gestación).

El embrión antes de su implantación debe establecer los mecanismos que evitarán la regresión del cuerpo lúteo, lo cual consigue mediante la secreción de interferón tau (INF τ), que bloquea la liberación de agentes luteolíticos.

Mortalidad embrionaria tardía: es la muerte embrionaria que tiene lugar después del reconocimiento materno de la gestación, pero antes de que la organogénesis se complete.

La ME tardía puede ser sospechada de su incidencia en toda hembra sana que retorna al celo postservicio después de un plazo superior a la duración normal del ciclo estral. Según Edey (1976), estos problemas se verían atenuados en condiciones normales de producción extensiva, debido a que la mayoría de las muertes ocurren lo suficientemente temprano en la preñez como para permitir un servicio sobre el celo retorno, antes que los carneros sean retirados. En consecuencia, se presentarían pariciones retrasadas con un incremento en la distribución temporal de los nacimientos.

Factores que afectan la sobrevivencia embrionaria

Las pérdidas embrionarias según sus causas pueden ser clasificadas como *basales*, aquéllas independientes de los efectos ambientales y ligadas con anormalidades genéticas, o por deficiencias del sistema materno para mantener la preñez. Las causas *inducidas* son aquéllas afectadas por los factores ambientales entre los que se considera primordial al factor nutricional. Tanto la subnutrición como la sobrealimentación pueden provocar alteraciones en el medio materno que impiden un adecuado desarrollo del embrión, afectando su viabilidad.

Causas Basales

Alteración de los gametos

Los espermatozoides y los ovocitos liberados para el proceso reproductivo, tienen una vida media muy corta, y envejecen rápidamente, pudiendo presentarse una disminución de la tasa de fertilidad e incremento del riesgo de que ocurra una ME precoz (Fernández Abella, 1993).

Desequilibrio o deficiencia hormonal

El transporte de los gametos, la fertilización y la implantación están condicionados por los niveles de las hormonas que tienen incidencia en el proceso reproductivo. Esto lleva a que alteraciones endocrinas provoquen pérdidas embrionarias en distintos estadios de desarrollo del embrión. Los niveles de progesterona son responsables directos de la sobrevivencia de los

embriones (Ainsworth y col., 1988). Algunos autores reportan una reducción en la ME asociada a la suplementación con progestágenos (Peterson y col., 1984; Kleeman y col., 1991). A su vez, los estrógenos juegan un papel secundario favoreciendo el flujo sanguíneo en el útero por medio de la vasodilatación y mantenimiento del cuerpo lúteo, responsable de la producción de progesterona.

Factores genéticos

La frecuencia y repetición de las pérdidas embrionarias están en parte condicionadas por el genotipo del padre y de la madre. Anomalías cromosómicas determinan la muerte embrionaria en la mayoría de los casos entre los días 2 a 3 de edad de los embriones, siendo su incidencia de baja magnitud (6-10%) (Long y Williams, 1980). En los genotipos prolíficos existe mayor ME a causa de su alta tasa ovulatoria. Se debe considerar que las pérdidas embrionarias son un medio biológico de eliminar tempranamente a los individuos con cromosomas defectuosos.

Causas inducidas

+

Factores nutricionales

En sistemas extensivos, el esquema nutricional al que están sometidos los animales presenta grandes fluctuaciones a lo largo del año (Lindsay y col., 1993), siendo la subnutrición un problema en los rebaños comerciales donde la alimentación está basada en el pastoreo. En ovinos algunos autores han reportado un incremento de la mortalidad embrionaria en diferentes días (11, 15, 21) de gestación en ovejas subnutridas sometidas a dietas restringidas o por un consumo disminuido (Abecia y col., 1999; Rhind y col., 1985). Parr y col., (1982) concluye que en ovejas con subnutrición en los primeros 35 días luego de la encambrada, se presenta un efecto de reducción del tamaño y peso de sus embriones, al verse limitado el desarrollo de los mismos. Estos autores plantean la existencia de un control del crecimiento del embrión a través de una reducción de las concentraciones de glucosa materna, en respuesta a situaciones de estrés nutricional. Deficiencias en minerales, particularmente en selenio y yodo, así como vitamina A, también incrementan las pérdidas embrionarias. Si la subnutrición es severa antes del servicio se puede presentar una tasa elevada de ME temprana antes de la implantación (Edey, 1969).

Cabe consignar que también los altos niveles de alimentación, asociados a elevado consumo en la preñez temprana, reducen la concentración de progesterona en plasma,

pudiendo alcanzar concentraciones cercanas al umbral crítico para la supervivencia del embrión.

Factores ambientales

La *temperatura ambiente* alta es especialmente perjudicial cuando se combina con una humedad elevada, resultando en bajos porcentajes de concepción y altas tasas de ME (Kleeman y col., 2005). Las alteraciones se produce en la maduración ovocitaria (Moor y Crosby, 1985), en el proceso de implantación y en el desarrollo embrionario (Dutt, 1964; Lindsay y col., 1975).

Las *precipitaciones* pueden generar un efecto estresante por pérdida de calor en la oveja, el estrés incide a nivel hipotalámico, activando las neuronas productoras de GABA (ácido gamma-amino-butírico) inhibiendo la secreción de GnRH, llegando a poder bloquear el pico preovulatorio de LH y por ende alterando el proceso de la ovulación (Dobson y col., 2003). Las precipitaciones abundantes pueden bloquear el celo, reducir la tasa ovulatoria e incrementar la ME precoz (Doney y col., 1973).

El *fotoperíodo* es otro factor a considerar debido a que incide sobre las ME a través de niveles deficitarios de progesterona que se presenta en la primavera, asociados a ovulaciones de baja competencia ovocitaria. Este efecto se da a través de un menor tamaño del cuerpo lúteo que ocasiona menores concentraciones plasmáticas de progesterona en sangre (Fernández Abella y col., 1994).

Enfermedades reproductivas (infecciosas y metabólicas)

En el ganado ovino, los principales agentes infecciosos que afectan el desarrollo y mantenimiento de la gestación provocando ME, son principalmente *Brucella ovis* y *Toxoplasma gondii* (Bonino y Cavestany, 2005).

La infección por *Brucella ovis* en ovejas se produce por vía venérea, produciendo pérdidas reproductivas por muerte embrionaria en los primeros días de gestación y/o abortos esporádicos. En los países donde se han medido las pérdidas ocasionadas por B.ovis, la disminución en la producción de corderos ha alcanzado al 20%, reduciendo hasta el 10% el nacimiento de mellizos (Homse A. y col., 1994).

La *toxoplasmosis* se desarrolla a partir de la ingesta de alimento o pasturas contaminadas con ooquistes emitidos por los felinos (Freyre, 2003). El efecto de esta enfermedad varía según el momento en que se contrae la infección; cuando ocurre en el inicio de la preñez se produce la muerte y reabsorción del embrión, dejando ovejas no gestantes.

Factores estresantes

El manejo ganadero inadecuado, el arreo con perros, el transporte, provocan una situación de estrés que incrementa la secreción de adrenalina, alterando los procesos hormonales involucrados en el mantenimiento y desarrollo de los embriones.

Mortalidad fetal

La mortalidad fetal (MF) en ovinos son causa de pérdidas económicas en las explotaciones ovinas, observándose la pérdida del feto desde el fin del período embrionario (día 35 de gestación) hasta el final de la gestación. La muerte fetal puede advertirse a través de un aborto, cuando se produce la expulsión prematura del feto no viable; o presentarse sin expulsión del feto, cuando el feto muere dentro del útero, presentando procesos de momificación y/o maceración. La identificación y el diagnóstico de los abortos en explotaciones extensivas de cría ovina son difíciles puesto que pocas veces puede encontrarse el feto y/o restos del aborto en los potreros de pastoreo de los animales (García Pérez y col., 2003).

Factores que afectan la viabilidad fetal

Las causas que afectan la viabilidad fetal son múltiples e incluyen etiologías muy diversas pudiendo dividirse comúnmente en 2 tipos: causas infecciosas y causas no infecciosas (Robles, 1996). Las *causas no infecciosas* pueden ser metabólicas, nutricionales, plantas tóxicas, medicamentosas, mal manejo y estrés. Los principales *agentes infecciosos* que provocan muerte fetal en el ovino se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Principales causas infecciosas de aborto en ovinos (Robles, 1996)

Enfermedad	Agente	Transmisión	Momento Del Aborto	Muestras de feto para aislamiento	Muestras de la madre para aislamiento
Brucelosis	<i>Brucella melitensis</i>	Ingestión Inhalación	Ultimo tercio Mortalidad perinatal	Contenido de estomago, hígado y bazo. Placenta	Flujo vaginal Leche
Brucelosis	<i>Brucella ovis</i>	Venérea	Corderos a término, Muerte perinatal	Contenido de estómago, hígado y bazo. Placenta	Flujo vaginal
Aborto enzoótico	<i>Chlamydia psittaci</i>	Ingestión	Ultimo mes de gestación Muerte perinatal	Cotiledones fetales. Placenta	Flujo vaginal
Campylobacteriosis	<i>Campylobacter fetus</i>	Ingestión	Último tercio Muerte perinatal	Contenido de estómago Focos necróticos en hígado	Flujo vaginal
Listeriosis	<i>Listeria monocytogenes</i>	Ingestión	A partir del 3° mes	Contenido estomacal Focos necróticos en hígado	Flujo vaginal Leche
Salmonelosis	<i>Salmonella abortus-ovis</i>	Ingestión	Ultimas 6 semanas	Contenido estomacal	Flujo vaginal
Toxoplasmosis	<i>Toxoplasma gondii</i>	Ingestión	Abortos a término Muerte perinatal	Pequeños focos de necrosis en cotiledones Fetales	

Conclusiones

Para la obtención de una elevada tasa de preñez es fundamental reducir las pérdidas embrionarias y fetales mediante un correcto manejo reproductivo, nutricional y sanitario, que permitirá la reducción de las pérdidas prenatales. Una alta eficiencia reproductiva posibilitará alcanzar el máximo potencial productivo de la majada, capitalizar el potencial genético del rebaño, a fin de contribuir al logro de un sistema productivo rentable.

Bibliografía

- Abecia J.A., Forcada F., Lozano J.M. (1999). A preliminary report on the effect of dietary energy on prostaglandin F2 α production in vitro, interferon-tau synthesis by the conceptus, endometrial progesterone concentration on days 9 and 15 of pregnancy and associated rates of embryo wastage in ewe. *Theriogenology* 52 (7), 1203-1213.
- Ainshworth, L. y col. (1988). Research and technology for increasing the efficiency and output of lamb production systems. Canada Agr. Res. Branch. Tech. Bull. 2°.
- Berain, J.P. (1984). La mortalité embryonnaire. Bulletin Technique de l' Insemination Artificielle 32, 15-17.
- Bonino, J., Cavestany, D. (2005). Aspectos de pérdidas reproductivas de origen infeccioso en ovinos. *Producción ovina* 17: 69-76.
- Diskin, M.G., Morris, D.G. (2008). Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reprod. Domest. Anim.* 43, 260–267.
- Dixon, A.B., Knights, M., Winkler, J.L., Marsh, D.J., Pate, J.L., Wilson, M.E., Dailey, R.A., Seidel, G., Inskeep, E.K. (2007). Patterns of late embryonic and fetal mortality and association with several factors in sheep. *J. Anim. Sci.* 85: 1274-1284.
- Dobson, H., Ghuman, S., Prabhakar, S., Smith, R. (2003). A conceptual model of the influence of stress on female reproduction. *Reproduction* 125:151-163.
- Dutt, H. (1964). Detrimental effects of high ambient temperature on fertility and early survival in sheep. *Inter. J. Biometeorology* 8:43-56,
- Edey, T. N. (1969). Prenatal mortality in sheep. A review. *Anim Breeding (Abstract)* 37, 173-190.
- Edey, T. N. (1976). Embryo mortality in sheep breeding. In *Sheep breeding. Australia*. pp. 400-410. (Proc. Inter. Congr. Muresk).
- Fernández Abella, D. (1993). Principios de fisiología reproductiva ovina. Universidad de la República. Editorial hemisferio sur. Cap. 8-9.
- Fernández Abella, D., Saldanha, S., Surraco, L., Villegas, N., Hernández, Z., Rodríguez Palma. (1994). Evaluación de la variación estacional de la actividad sexual y crecimiento de lana en cuatro razas ovinas. *Boletín Técnico de Ciencias Biológicas* 4:19-43.
- Freyre, A. (2003). Toxoplasmosis en la majada. XXXI Jornadas Uruguayas de Buiatría. 26 - 27.
- García Pérez, A.L.; Aduriz, G.; Moreno, B. (2003). Necropsia y toma de muestras de abortos ovinos. *Revista Ovis*, Mayo 86:65-76.
- Hafez E. (1996). Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. Interamericana McGraw-Hill. México.
- Homse, A., Casaro, A., Campero, C., Paolicchi, F., Terzolo, H. (1994). Infección experimental en ovejas por *Brucella ovis*. *Rev.Med.Vet.* 75:302- 306.

- Kleeman, D.O., Walker, S.K., Grimson, R.J., Smith, D.H., Grosser, T.I., Seamark, R.F. (1991). Exogenous progesterone and embryo survival in Booroola-cross ewes. *Reprod. Fertil. Dev.* 3:71-77.
- Kleemann, D. W., Walker, S. K. (2005). Fertility in South Australian commercial Merino flocks: sources of reproductive wastage. *Theriogenology* 63: 2416-2433.
- Lindsay, D.R., Knight, T.W., Smith, J.F., Oldham, C.M. (1975). Studies in ovine fertility in agricultural regions of Western Australia: ovulation rate, fertility and lamb performance. *Austr. J. Agric. Res.* 26:189-198.
- Lindsay D., Martin G., Williams I. (1993). Nutrition and reproduction. In "Reproduction in Domesticated Animals", pp. 459-491. (Elsevier Science, Amsterdam).
- Long, S.E., Williams, C.V. (1980). Frequency of chromosomal abnormalities in early embryos of domestic sheep (*Ovis aries*). *J. Reprod. Fert.* 58:197-201.
- Martal, J., Chene, N., Camous, S., Huynh, L., Lantier, F., Hermier, P. L'haridon, R., Charpigny, G., Charlier, M., Chaouat, G. (1997). Recent developments and potentialities for reducing embryo mortality in ruminants: the role of IFN-tau and other cytokines in early pregnancy. *Reprod. Fertil. Dev.* 9, 355-80.
- Moor, R.M., Crosby, I.M. (1985). Temperature-induced abnormalities in sheep Oocytes during maturation. *J. Reprod. Fert.* 75:467-473.
- Niswender, G.D., Nett, T.M. (1994). Corpus luteum and its control in infraprimates species. In "The Physiology of Reproduction", pp. 781- 816. Eds Knobil, E. y Neill J.D. (Raven Press, New York).
- Parr, R., Cumming, I.A., Clarke, I.J. (1982). Effects of maternal nutrition and plasma progesterone concentrations on survival and growth of the sheep embryo in early gestation. *J. Agric. Sci. Camb.* 98:39-46.
- Peterson, A.J., Barnes, D., Shanley, R., Welch, R.A.S. (1984). Administering progesterone after mating improves pregnancy rate in sheep. *Proc. N. Z. SOC. Endocrinology* 21:13.
- Rhind, S.M, Robinson, J.J., McDonald, I. (1980). Relationships among uterine and placental factors in prolific ewes and their relevance to variations in fetal weight. *Anim. prod.* 30: 115-124.
- Rhind S.M, Leslie I.D, Gunn R.G, Doney J.M. (1985). Plasma FSH, LH, prolactin and progesterone profiles of cheviot ewes with different levels of intake before and after mating, and associated effects on reproductive-performance. *Anim Reprod Sci* 8, 301–313.
- Robles, C. A. (1996). Aborto ovino. Ed. SIRSA-INTA Bariloche pp.16.
- Schrick, F.N., Inskeep, E.K. (1993). Determination of early pregnancy in ewes utilizing transrectal ultrasonography. *Theriogenology* 40, 295-306.
- Walsh, S.W., Williams, E.J., Evans, A.C.O. (2011). A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 123, 127–138.

Wilkins, J.F. Croker, K. P. (1990). Embryonic wastage in ewes. In. Reproductive physiology of Merino sheep; concepts and consequences. Austr. School Agr., Univ. Western Austr. 13: 169-177. Addham C. M., Martin G. B. and Purvis I. W. Eds.

El autor/Los autores

Stornelli María Alejandra

M.V, Dr. en Cs.Veterinarias, Profesor Adjunto, Investigador, Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina

De la Sota Rodolfo Luzbel

M.V, MSc., PhD, Diplomado ECAR, Investigador Independiente CONICET, Profesor Titular, Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

ALDABE, WALTER GASTÓN, M.V. Docente, Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

AZCURRA, MIRIAM BEATRIZ, , M.V., Docente Investigadora, Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

BARRALES, HERNAN M.V. Becario Doctoral UNLP, Docente Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

BONAURA, MARÍA CANDELA, M.V., Becaria Doctoral CONICET, Docente Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina

BOTTINO, ADRIÁN LEOPOLDO, M.V. Docente, Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

BRUNO GALARRAGA, MARÍA MACARENA, M.V., Becaria Doctoral CONICET, Grupo de Genética y Reproducción, INTA, EEA Bariloche, Rio Negro, Argentina

CHIOZZA LOGROÑO, JOAQUIN, M.V., Becario Doctoral CONICET, Docente Cátedra de Fisiología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina

COMPAGNONI, MARICEL, M.V. Docente, Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

CUETO, MARCELA ISABEL, Ing. Agrónoma, Investigador INTA, Grupo de Genética y Reproducción, INTA, EEA Bariloche, Rio Negro, Argentina.

DE LA SOTA, RODOLFO LUZBEL, M.V, MSc., PhD, Diplomado ECAR, Investigador Independiente CONICET, Profesor Titular, Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

DOMÍNGUEZ, GERMÁN, M.V., Práctica privada Reproducción Bovina, Venado Tuerto, Santa Fe, Argentina

FERNANDEZ, JIMENA, M.V., Becaria Doctoral FonCyT, Grupo de Genética y Reproducción, INTA, EEA Bariloche, Rio Negro, Argentina.

FERNANDEZ, VALERIA CAROLINA, M.V. Docente, Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

GARCÍA MARÍA FLORENCIA, M.V., Becaria Alumna UNLP, Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

GARCÍA MITACEK, MARÍA CARLA, .M.V., Dr. en Cs.Veterinarias, Becaria Posdoctoral CONICET, Docente, Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

GIBBONS, ALEJANDRO, M.V., Investigador INTA, Grupo de Genética y Reproducción, INTA, EEA Bariloche, Rio Negro, Argentina.

GÓMEZ, MARÍA VERANO, , M.V., Docente Investigadora, Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

JAUREGUIBERRY, MARÍA, M.V., Becaria Doctoral CONICET, Docente Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

LACAU ISABEL MARÍA, Lic. En Cs. Biológicas, Dr en Cs. Biológicas, Investigador Independiente CONICET, Laboratorio de Regulación Hipofisiaria IBYME, CABA, Argentina.

MADOZ, LAURA VANINA, M.V, Dr. en Cs.Veterinarias, Investigador Asistente CONICET, Docente Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

MIGLIORISI, ANA LORENA, M.V., Docente Investigadora, Laboratorio de Reproducción Animal,-Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

NUÑEZ FAVRE, ROMINA DE LOS ANGELES, M.V, Dr. en Cs.Veterinarias, Investigador Asistente CONICET, Docente Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

PRADERIO, ROMINA GISELE, M.V., Becaria Doctoral CONICET, Docente Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

SOTO ANDRÉS TELÉSFORO, M.V, Dr. en Cs.Veterinarias, Profesor Adjunto, Investigador, Laboratorio de Reproducción Animal,-Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

STORNELLI, MARÍA ALEJANDRA, M.V, Dr. en Cs.Veterinarias, Profesor Adjunto, Investigador, Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

STORNELLI, MARÍA CECILIA, M.V, Dr. en Cs.Veterinarias, Docente, Investigador, Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

TITTARELLI, CLAUDIA MARCELA, M.V., Dr. en Cs.Veterinarias, Docente Investigadora, Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

VLEK, JESSICA ALEJANDRA, M.V. Docente Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

WILLIAMS, SARA INÉS, M.V, Dr. en Cs.Veterinarias, Profesora Adjunta, Investigadora, Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

Gladys Susan López
Virginia Michelli

Problematizando la salud : aportes conceptuales y experiencias de trabajo en territorio desde la perspectiva de la medicina social-salud colectiva / Gladys Susan López ... [et al.] ; coordinación general de Gladys Susan López ; Virginia Michelli. - 1a ed. - La Plata : Universidad Nacional de La Plata, 2016.

Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga y online
ISBN 978-950-34-1427-9

1. Medicina Social. 2. Servicios de Salud Comunitaria . I. López, Gladys Susan II. López, Gladys Susan, coord. III. Michelli, Virginia, coord.
CDD 362.1

Universidad Nacional de La Plata – Editorial de la Universidad de La Plata
47 N.º 380 / La Plata B1900AJP / Buenos Aires, Argentina
+54 221 427 3992 / 427 4898
edulp.editorial@gmail.com
www.editorial.unlp.edu.ar

EduLP integra la Red de Editoriales Universitarias Nacionales (REUN)

Primera edición, 2016
ISBN 978-950-34-1427-9
© 2016 - EduLP

FACULTAD DE
TRABAJO SOCIAL

S
sociales



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA