

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**UTILIZACIÓN DE MEDICIONES TESTICULARES Y EVALUACIÓN SEMINAL
ESTACIONAL EN PERROS OVEJERO ALEMÁN**

“por”

Br. María Eugenia KEUERK BARATTA

**TESIS DE GRADO presentada
como uno de los requisitos para
obtener el título en Doctor en
Ciencias Veterinarias
Orientación: Medicina Veterinaria**

MODALIDAD: Ensayo Experimental

MONTEVIDEO

URUGUAY

2013

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de Mesa:

Prof. Dr. Daniel Cavestany

Segundo Miembro (Tutor):

Prof. Adj. Dr. Danilo Fila

Tercer Miembro:

Prof. Dr. Alejandro Bielli

Cuarto Miembro:

Dr. Fernando Fumagalli

Quinto Miembro:

Dr. Fernando Macedo

Fecha:

Viernes, 10 de mayo de 2013

Autores:

Br. María Eugenia Keuerk Baratta

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Danilo Fila por su tutoría en este trabajo.

Al Dr. Fernando Fumagalli por su colaboración en la realización de las actividades prácticas.

Al Dr. Fernando Macedo por su esencial aporte en el análisis estadístico.

Al personal del Plantel de Perros de Policía de la Jefatura de Montevideo, tanto humano como animal.

Al personal de Biblioteca y Hemeroteca por su ayuda, disposición y proporción del material bibliográfico.

A mi familia por su apoyo incondicional y su confianza durante toda mi carrera.

A mis amigos y compañeros por ayudarme y acompañarme en estos años de estudio.

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	- 2 -
AGRADECIMIENTOS.....	- 3 -
LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.....	- 5 -
1. RESUMEN.....	- 6 -
2. SUMMARY.....	- 7 -
3. INTRODUCCIÓN.....	- 8 -
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	- 10 -
4.1 Diferenciación sexual masculina.....	- 10 -
4.2 Anatomía, histología y fisiología testicular.....	- 11 -
4.3 Espermatogénesis.....	- 15 -
4.4 Espermatozoides.....	- 18 -
4.5 Semen canino.....	- 19 -
4.5.1 Extracción de semen en el perro.....	- 22 -
4.5.2 Evaluación seminal.....	- 22 -
4.5.2.1 Macroscópica.....	- 22 -
4.5.2.2 Microscópica.....	- 23 -
4.6 Mediciones testiculares.....	- 25 -
4.7 Estacionalidad.....	- 27 -
5. OBJETIVOS.....	- 30 -
5.1 General.....	- 30 -
5.2 Específicos.....	- 30 -
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	- 31 -
7. RESULTADOS.....	- 33 -
8. DISCUSIÓN.....	- 36 -
9. CONCLUSIONES.....	- 38 -
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	- 39 -

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

	Página
Figura 1. Posición de los testículos en el perro.....	- 11 -
Figura 2. Estructuras de un testículo.....	- 12 -
Figura 3. Composición de un túbulo seminífero.....	- 13 -
Figura 4. Eje hipotálamo-hipófisis-gonadal.....	- 15 -
Figura 5. Espermatogénesis.....	- 17 -
Figura 6. Partes principales del espermatozoide del mamífero....	- 19 -
Tabla 1. Características del eyaculado canino.....	- 20 -
Tabla 2. Algunos detalles en la composición del semen en el perro..	- 21 -
Tabla 3. Valores y límites tolerables de los mismos de las características del eyaculado del perro, de acuerdo con el peso corporal.....	- 24 -
Tabla 4. Nomenclatura para análisis de semen.....	- 25 -
Tabla 5. Valores promedio de las variables cuantitativas en el semen de canes Ovejero Alemán.....	- 25 -
Tabla 6. Promedios y error est. de la edad, peso y mediciones testiculares.....	- 33 -
Tabla 7. Promedios y error est. de los parámetros seminales evaluados.....	- 33 -
Tabla 8. Promedios y errores estándar de las mediciones testiculares en las diferentes estaciones del año.....	- 34 -
Tabla 9. Promedios y errores estándar de los parámetros seminales analizados en las diferentes estaciones del año.....	- 34 -
Tabla 10. Correlaciones entre las medidas testiculares (ATE, I y V) y el Número total de espermatozoides y la Concentración.....	- 35 -

1. RESUMEN

Un análisis sistemático y planificado de los reproductores basado en la evaluación reproductiva de un perro debería apuntar a la búsqueda de la fertilidad óptima (buscando el mayor número posible de cachorros). El objetivo de este proyecto fue estimar la utilidad de tres diferentes métodos para determinar el volumen testicular (Ancho Total del Escroto, Índice y Fórmula Matemática) en relación al número total de espermatozoides y la concentración del eyaculado muestreado, así como su variación estacional, edad y peso de los animales, en la evaluación del potencial reproductivo. Se utilizaron 22 machos de la raza Ovejero Alemán del Plantel de Perros de la Policía de Montevideo. Las características de selección para los machos fueron un mínimo de 18 meses al inicio del estudio, dos testículos descendidos y sin observaciones al examen clínico general. La evaluación de los animales seleccionados, tanto testicular como de semen, se realizó durante un año. Los muestreos se llevaron a cabo en las cuatro estaciones marcadas: otoño (marzo-abril), invierno (junio-julio), primavera (setiembre-octubre) y verano (diciembre-enero). La medición de los testículos fue realizada con un calibre, por medio de este se midió el ancho total del escroto (ATE), también se determinó un índice mediante la fórmula: $I = (Ld + Li / 2) \times ATE$, (Ld y Li son el largo del testículo derecho y del izquierdo más epidídimo), y una fórmula que predice el volumen de los testículos $V = 0,5236 (L)(ATE)^2$, como un esferoide prolado (L es el largo total de los testículos). La segunda fracción del semen fue colectada por manipulación digital y se evaluó macroscópica y microscópicamente. Para el análisis de los datos se hicieron evaluaciones con el test de varianza (ANOVA) y coeficientes de correlación entre mediciones testiculares con el número total de espermatozoides y con la concentración del eyaculado muestreado, así como la concentración del eyaculado muestreado y las diferentes estaciones del año, peso y edad. Se realizaron 88 mediciones testiculares y 81 colectas y evaluaciones de semen de los 22 perros muestreados. La edad promedio general de los animales durante el experimento fue de $78,10 \pm 27,35$ meses y el peso de $34,97 \pm 3,52$ kg. De todos los parámetros seminales nos centramos en la concentración y en el número total de espermatozoides, que reflejaron valores promedios en todo el ensayo de $460,67 \pm 193,60$ mill/ml y $1264,47 \pm 703,71$ mill respectivamente. No se encontró diferencias entre ninguno de los parámetros evaluados por el test de ANOVA ni correlaciones significativas. A partir de los resultados obtenidos, concluimos en cuanto a las mediciones testiculares que no se encontró una relación con el número total de espermatozoides y la concentración. Con respecto al número total de espermatozoides y la concentración del eyaculado muestreado tampoco se vio una relación directa con la edad y el peso de los animales, así como una variación estacional de dichos parámetros. En nuestras condiciones de trabajo, no vimos de utilidad las mediciones testiculares para predecir la calidad seminal.

2. SUMMARY

A systematic and planned analysis of breeders based on the reproductive assessment should aim at finding the optimal fertility (seeking the greatest possible number of puppies). The purpose of this project was to estimate the usefulness of three different methods for determining testicular volume (Total Scrotal Width, Index and Mathematical Formula) relative to the total number of sperm and the concentration of the ejaculated sampled and its seasonal variation, age and weight of the animals sampled, in assessing the reproductive potential. Twenty two German Shepherd males dogs from the Police from Montevideo were used. The characteristics of the selected males were a minimum of 18 months old at the beginning of the study, two descended testicles and no observation in clinical examination. The evaluation of the selected animals, testicular and semen evaluation, was performed for a year. Sampling was conducted in the four seasons: autumn (March-April), winter (June-July), spring (September-October) and summer (December-January). Testes measurement was performed with a caliber, through it it was measured the Total Scrotal Width (TSW), an index was also determined using the formula: $I = (RI + LI / 2) \times TSW$ (RI and LI is the length of the right and left testicle plus epididymis) and a formula which predicts the testis volume $V = 0.5236 (L) (TSW)^2$, as a prolate spheroid (L is the total length of the testes). The second semen fraction was collected by digital manipulation and was macroscopically and microscopically evaluated. To analyze the data there will be made evaluations with the variance test (ANOVA) and correlation coefficients among testicular measurements and the total sperm number and concentration of the ejaculated sampled, as well as the ejaculated sampled concentration and the different seasons, age and weight. There were performed 88 testicular measurements and 81 collections and semen evaluation of the 22 dogs sampled. The overall average age of the animals during the experiment was 78.10 ± 27.35 months and the average weight was 34.97 ± 3.52 kg. Of all semen parameters we focus on the concentration and total sperm number, which reflected average values throughout the test 460.67 ± 193.60 million / ml and 1264.47 ± 703.71 million respectively. No difference was found between any of the parameters evaluated by ANOVA neither significant correlation. Based on the results, it can be conclude regarding testicular measurements, that it was found no relation to the total number of sperm and concentration. With respect to the total number of spermatozoa and the concentration of the ejaculate sampled there was no relation to the age and weight of the animal as well as seasonal variation of these parameters. In our working conditions, we saw no utility on testicular measurements to predict semen quality.

3. INTRODUCCIÓN

Hoy en día, los veterinarios son requeridos para evaluar la aptitud reproductiva en caninos de diferentes razas o estudiar su fertilidad, por lo tanto es importante definir claramente los diferentes conceptos sobre la fertilidad (Allen, 1993). Existe un considerable mal uso de los términos relacionados a la fertilidad, infertilidad y diferentes grados de subfertilidad. Las siguientes definiciones fueron establecidas por un comité de la Facultad de Veterinaria de Cornell, interesado en la nomenclatura de los padecimientos reproductivos de los animales domésticos. La **fertilidad** se define como una reproducción exitosa, la **infertilidad** como una pérdida temporal de la fertilidad, la **subfertilidad** como una capacidad inferior a la media para producir descendencia, y la **esterilidad** como la pérdida permanente de la fertilidad (Mc Donald, 1991).

En general los propietarios o criadores buscan asistencia reproductiva veterinaria cuando un perro ha montado varias veces a una perra en varios celos consecutivos, o a varias perras, sin resultados positivos. La subfertilidad en caninos puede incluir una variedad de problemas, como ser fallas durante la cópula y fallas en la concepción tras apareamientos aparentemente normales. Últimamente, se ha desarrollado la inseminación artificial en el canino, lo que permite un desarrollo productivo mayor. Asimismo, el uso de semen congelado ha sido aprobado por Kennels en Estados Unidos desde 1981 (Concannon y Batista, 1986). El desarrollo actual, por tanto, requiere una estandarización de los métodos de evaluación del semen en forma objetiva y repetible, así como su posible correlación con las evaluaciones clínicas de los testículos y posibles variaciones estacionales.

Según Oettle y Soley (1988), la evaluación reproductiva de un perro deberá basarse siempre en la búsqueda de la fertilidad óptima (buscando el mayor número posible de cachorros), en contraste con el concepto de aptitud reproductiva potencial tradicionalmente utilizado. Muchas veces el criador se conforma con un solo ejemplar de cría, pudiendo aspirar al máximo potencial.

Los métodos para evaluar la fertilidad en machos han sido desarrollados fundamentalmente en animales de producción, existiendo escasos estudios en mascotas. La comparación de técnicas tradicionales, como la determinación de las dimensiones testiculares y de las características y parámetros conocidos de semen, nos ayudarán a acercarnos más al potencial reproductivo máximo en perros.

El análisis de semen no puede ser utilizado para predecir la fertilidad del animal en forma exacta. La evaluación de la fertilidad incluye, entre otros requisitos, la capacidad de montar y copular con normalidad. Pero, la fertilidad puede demostrarse fehacientemente solo si el perro produce descendencia (Linford y col., 1976; Allen, 1993).

El análisis del semen es necesario por varias razones: para confirmar la espermatogénesis normal en un perro joven antes de comenzar a usarlo como semental, como parte de cualquier programa de inseminación artificial, en casos de infertilidad, para comprobar la producción de semen tras una enfermedad o terapia con fármacos, y para investigar el efecto de la enfermedad prostática

sobre la calidad del semen (Allen, 1993). El semen de baja calidad se relaciona no solo con bajas tasas de preñez sino también con producción de camadas de bajo número de cachorros (Stornelli, 2003). La evaluación debe ser macro y microscópica. Macroscópicamente se evalúa a simple vista, incluye volumen, color y pH. Y microscópicamente evaluamos motilidad, morfología y concentración espermática.

Las medidas testiculares, que son simples y baratas de obtener, han sido utilizadas para predecir la producción espermática y la calidad seminal. La medición de la circunferencia escrotal es una medida indirecta de la capacidad de producción de semen de un macho. Son varios los autores que concuerdan en que las mediciones escrotales son simples, baratas de obtener, y que se pueden utilizar para predecir la producción de espermatozoides y la calidad de semen en toros (Elmore y col., 1976, Coulter y Foote, 1979, Gipson y col., 1985, Bailey y col., 1996). Otros han reportado una correlación entre la circunferencia escrotal y el volumen del epitelio seminífero (Veeramachaneni y col., 1986).

En cuanto a la especie canina, Olar y col., (1983) plantean que el ancho total de escroto es un buen predictor de fertilidad. En la raza Ovejero Alemán existe un estudio (Cortez y col., 2002), que determinó una baja correlación entre la concentración espermática y el perímetro escrotal. Similares resultados fueron obtenidos por England (1991).

En cuanto a la estacionalidad reproductiva en el macho canino la bibliografía es escasa, siendo más difundida en otras especies animales que tienen una estacionalidad reproductiva más marcada. La estacionalidad de la reproducción es un proceso fisiológico de adaptación utilizado por los animales salvajes para enfrentarse a los cambios estacionales en su entorno, y en especial, a la disponibilidad de alimento. El fotoperíodo es el principal factor medioambiental que determina el inicio y la duración de las estaciones reproductivas (Gordon, 2006).

La estacionalidad en las especies caninas ha sido un tema de constante desacuerdo por muchos años entre autores. La estacionalidad es un atributo de cánidos silvestres como lobos (*Canis lupus*), coyotes norteamericanos (*Canis latrans say*), perros salvajes (*Canis azore*, como por ejemplo el perro Dingo Australiano), así como la raza Basenji dentro de los perros domésticos (*Canis familiaris*). El lobo, el coyote del norte y el perro salvaje muestran el estro durante el invierno. El perro Basenji entra en el estro durante un período limitado en otoño (Bouchard y col., 1991).

En el perro las concentraciones espermáticas son más altas en primavera. La libido, la motilidad y la concentración de testosterona no son afectadas por la estacionalidad (Taha y col., 1981).

Generalmente, la selección de machos se realiza fenotípicamente. Pero, una evaluación sistemática planificada podría evitar seleccionarlos por el método de "ensayo y error", costoso en tiempo y recursos. Esta tesis pretende colaborar en la determinación del máximo potencial reproductivo de un perro, aplicando determinadas técnicas y maniobras realizadas sobre el reproductor, así como evaluar la variación estacional en algunos parámetros seminales.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1 Diferenciación sexual masculina

La diferenciación del aparato reproductor es un complejo proceso que implica una serie de mecanismos diferentes que operan durante varias etapas del desarrollo (Carlson, 1990).

Dos cromosomas X (XX) provocan el desarrollo de los ovarios y un fenotipo femenino, mientras que la presencia de un cromosoma Y (XY) conduce a la formación de testículos y un desarrollo masculino. Es decir, que la diferenciación sexual empieza estableciendo el sexo cromosómico en el momento de la fecundación, y sigue con el desarrollo de las gónadas durante la fase embrionaria. Dependiendo de ésta finalmente aparecen las características sexuales secundarias o fenotipo sexual (Peterson y Aurich, 2005).

La primera etapa crítica de la diferenciación sexual ocurre al momento de la fecundación, cuando el sexo genético del cigoto se determina por la naturaleza del cromosoma sexual que contribuye el esperma.

La decisión de desarrollar un testículo a partir de un brote gonadal indiferenciado depende esencialmente de un único gen localizado en el brazo corto del cromosoma Y, el gen SRY (región determinante del sexo del cromosoma Y). El SRY codifica el factor determinante del testículo (TDF), éste estimula la expresión del gen necesario para la formación de los testículos (Peterson y Aurich, 2005).

El desarrollo del testículo depende también de la presencia de un componente de la superficie celular en las células del mesodermo intermedio relacionado con el cromosoma Y. Se trata de una proteína de la superficie celular, de un antígeno de histocompatibilidad, el antígeno H-Y. Las células que liberan el antígeno H-Y son las mismas que se diferencian en células de sostén (Sertoli). En ausencia del antígeno H-Y la gónada formará un ovario, independientemente del genotipo de las células (Noden y de Lahunta, 1990).

La siguiente fase de la diferenciación sexual en el embrión radica en la diferenciación del sexo somático. El embrión temprano desarrolla un conjunto dual de conductos genitales potenciales. Uno de ellos, el conducto mesonéfrico original, persiste hasta que el mesonefros se degenera en un órgano excretor en tanto que el otro es el recién formado par de conductos que recibe el nombre de conductos paramesonéfricos o de Muller (Carlson, 1990).

El primer indicio en la formación de un testículo es el desarrollo de células de Sertoli fetales y su congregación en los cordones seminíferos primitivos en los que se envuelven las células germinales. Mientras que la diferenciación de las células de Sertoli a partir de las células primitivas de sostén empieza por efecto del SRY, el resto del desarrollo testicular depende esencialmente del control hormonal.

La testosterona, secretada por las células intersticiales de Leydig estimula el crecimiento de los conductos mesonéfricos y su diferenciación en el sistema de conductos masculinos; en tanto que otro factor distinto, producido por las células de Sertoli (factor inhibidor de Müller u Hormona anti-mülleriana) inhibe el desarrollo de los conductos paramesonéfricos y produce su degeneración. El desarrollo del seno urogenital y de los genitales externos en el macho es un proceso testosterona-dependiente. Las células del mesénquima de estos tejidos incorporan la testosterona y la convierten en dihidrotestosterona (que es la sustancia activa), por medio de la 5- α -reductasa. También se debe a la testosterona el crecimiento de la próstata y del tubérculo genital, al margen del sexo genético de los tejidos (Noden y de Lahunta, 1990).

4.2 Anatomía, histología y fisiología testicular

Los testículos son órganos sólidos elipsoidales, cuyo volumen no guarda una proporción fija con el tamaño del cuerpo. Entre las especies domésticas varía su orientación y tamaño. Como se muestra en la Figura 1, en el perro tienen una orientación horizontal (Dyce, 1999).

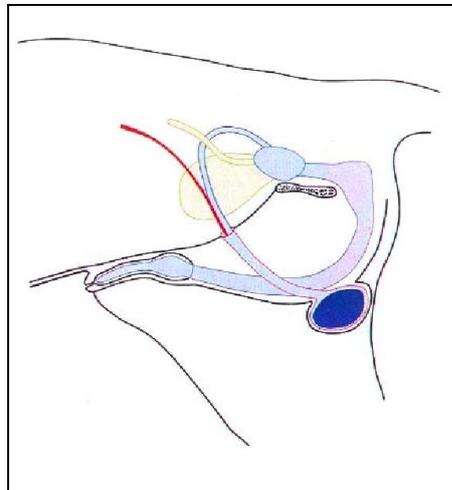


Figura 1. Posición de los testículos en el perro. (Dyce, 1999).

Las funciones primarias de los testículos son: la producción de espermatozoides (exocrina), y la secreción de testosterona (endocrina) (Dellman y Carithers, 1999).

El descenso de los testículos al escroto suele producirse en el perro 5 días después del nacimiento (Cunningham y Bradley, 2009).

El testículo en su descenso al escroto se acompaña de una evaginación del peritoneo, la túnica vaginal, formada por una capa parietal y otra visceral, envuelve las superficies anterior y lateral de cada testículo (Fawcett, 1995).

El testículo, que se encuentra alojado en el escroto, está envuelto por una cápsula sólida de tejido conectivo denso e irregular, la túnica albugínea. Ésta se continúa con trabéculas de tejido conectivo, también llamados Septula Testis,

que convergen hacia el mediastinum testis. Estas trabéculas son septos bastante complejos en el perro y en el verraco. Los Septula Testis dividen el parénquima testicular en un número variable de lobulillos testiculares, conteniendo cada uno de ellos, de uno a cuatro túbulos seminíferos contorneados. (Dellman y Wrobel, 1993).

Los túbulos seminíferos son extremadamente tortuosos, la mayoría de ellos forman asas contorneadas, aunque algunos se ramifican y otros terminan de forma ciega (Figura 2). En el estrecho ápex de cada lobulillo testicular se produce la transición abrupta de sus túbulos seminíferos hacia los túbulos rectos, de escasa longitud, que convergen en la denominada rete testis. Ésta es un plexo de espacios revestido por epitelio que se sitúa en el tejido conjuntivo del mediastino testicular. Desde los túbulos rectos salen una serie de conductillos eferentes a través de los cuales los espermatozoides alcanzan el conducto epididimario (Fawcett, 1995).

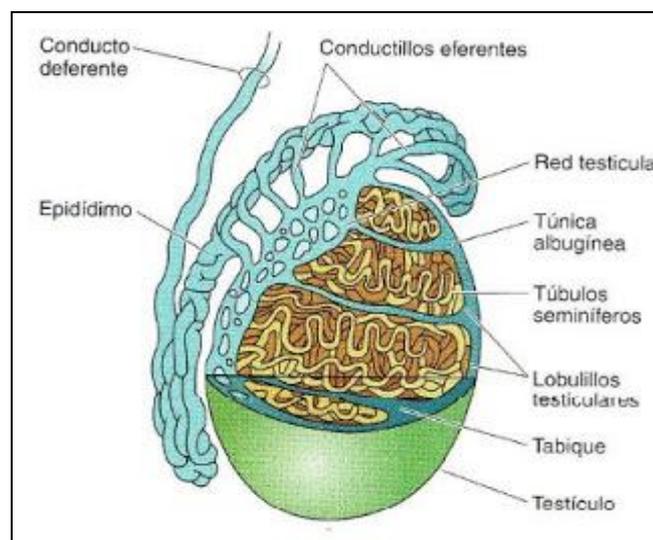


Figura 2. Estructuras de un testículo.

(Fuente: <http://anatomiatest.blogspot.com/2009/04/histologia.html>).

El parénquima testicular es blando, de apariencia amarillenta o pardusca, y está constituido por los túbulos seminíferos y tejido intersticial. Este último está formado de grandes células intersticiales, las células de Leydig, sustentadas por una estructura delicada de tejido conectivo por la que se disponen pequeños vasos sanguíneos y linfáticos (Dyce, 1999). Las células de Leydig sintetizan y secretan testosterona. Entre las principales funciones de la testosterona se destacan: promover el comportamiento sexual normal, estimular el crecimiento y mantenimiento de la función de las glándulas accesorias masculinas y de los caracteres sexuales secundarios, control de la espermatogénesis (junto con la FSH), acción de retroalimentación negativa sobre la hipófisis y el hipotálamo, efectos anabólicos generales y mantenimiento prenatal del conducto de Wolff y su diferenciación en conducto deferente y epidídimo (Dellman y Wrobel, 1993).

Los túbulos seminíferos están revestidos por un epitelio estratificado, que contiene las células espermatogénicas y las células de Sertoli, de sostén. Las células espermatogénicas pueden ser de varios tipos morfológicamente diferenciables: espermatogonias, espermatoцитos primarios, espermatoцитos secundarios, espermátidas y espermatozoides. Las células de Sertoli proporcionan un soporte nutricional y mecánico y, gracias a las modificaciones que presentan en su configuración, participan activamente en el movimiento ascendente de las células germinales en fase de diferenciación y en la liberación de los espermatozoides hacia la superficie libre del epitelio (Figura 3). También producen una proteína fijadora de andrógenos (ABP), la transferrina, y la inhibina (Fawcett, 1995).

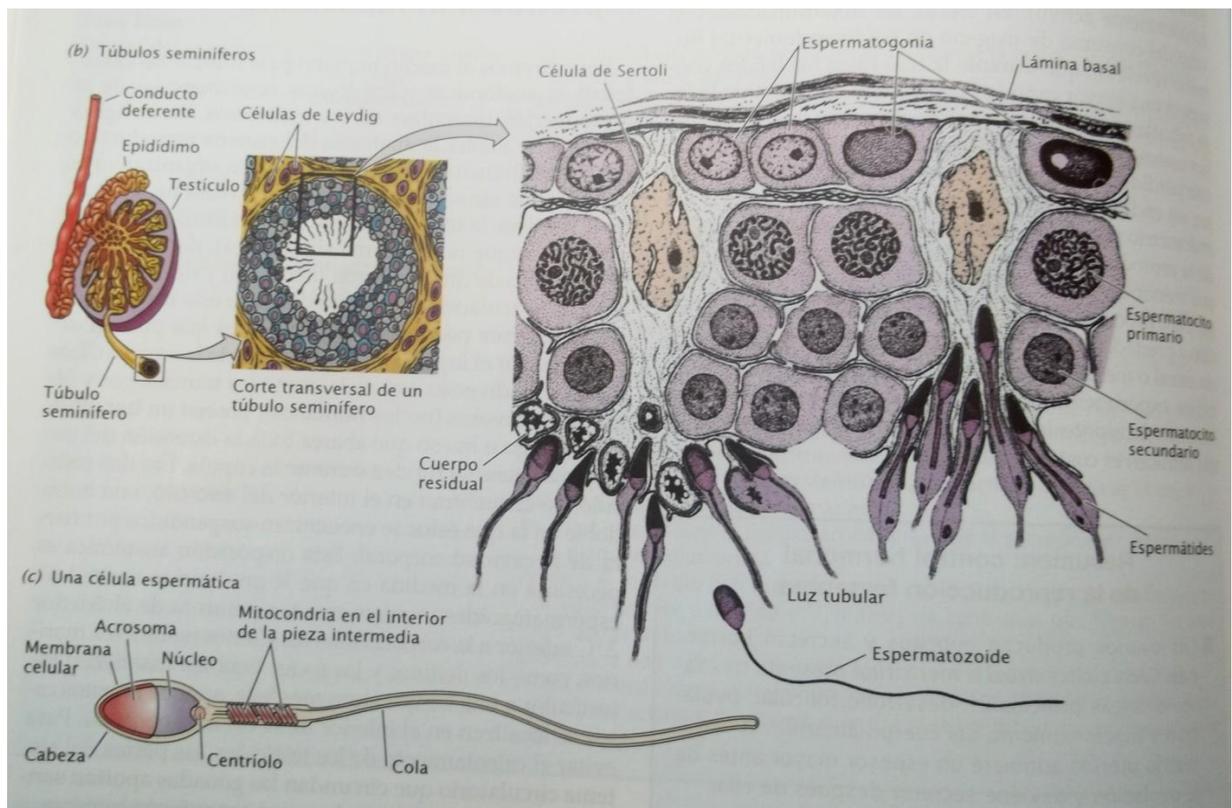


Figura 3. Composición de un túbulo seminífero.
(Hill R y col. , 2006).

El epidídimo es un órgano firme, macroscópicamente se divide en cabeza, cuerpo y cola. Está formado fundamentalmente por el conducto epididimario y los conductillos eferentes, que conectan la rete testis con el conducto epididimario. Este es un conducto largo y tortuoso. Durante su pasaje a través del conducto epididimario, los espermatozoides adquieren la capacidad fecundante completa. Estos se almacenan en la cola del epidídimo hasta el momento de la eyaculación (Dellman y Carithers, 1999).

El conducto deferente constituye, junto a la arteria espermática, las ramas nerviosas, y el plexo pampiniforme, el cordón espermático que aparece a su vez rodeado por el músculo cremáster. En los carnívoros, el conducto deferente

desemboca en la uretra y en su porción terminal se expande formando una ampolla fusiforme y contiene glándulas simples tubuloalveolares ramificadas.

La próstata es la única glándula accesoria que tiene el perro. Se trata de una glándula lobulada que está localizada sobre el cuello de la vejiga y el comienzo de la uretra, ventral al recto. Está formada por dos lóbulos laterales y un istmo que la conecta. En el perro está bien desarrollada y aporta un gran volumen de fluido a la eyaculación, que es liberado en su mayor parte como una fracción postesperma del eyaculado. La próstata elabora una proteína conjugada llamada antiaglutinina cefálica que previene la aglutinación de los espermatozoides (Aguera, 2005).

4.3 Espermatogénesis

Se llama espermatogénesis a la formación, almacenamiento y posterior expulsión de los espermatozoides a partir de las espermatogonias (Aguera, 2005).

Es el proceso por el cual, a partir de células germinales masculinas diploides, se obtienen espermatozoides por meiosis. Durante el desarrollo embrionario las células germinales primordiales pasan por diversas fases de multiplicación y se diferencian en espermatogonias. Mientras tanto permanece el bloqueo de la meiosis que impide que las espermatogonias entren en meiosis y alcancen la madurez sexual. Con el inicio de la pubertad se activa el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas y se induce la espermatogénesis por efecto de aumentos en la concentración plasmática de FSH y testosterona (Peterson y Aurich, 2005). (Figura 4).

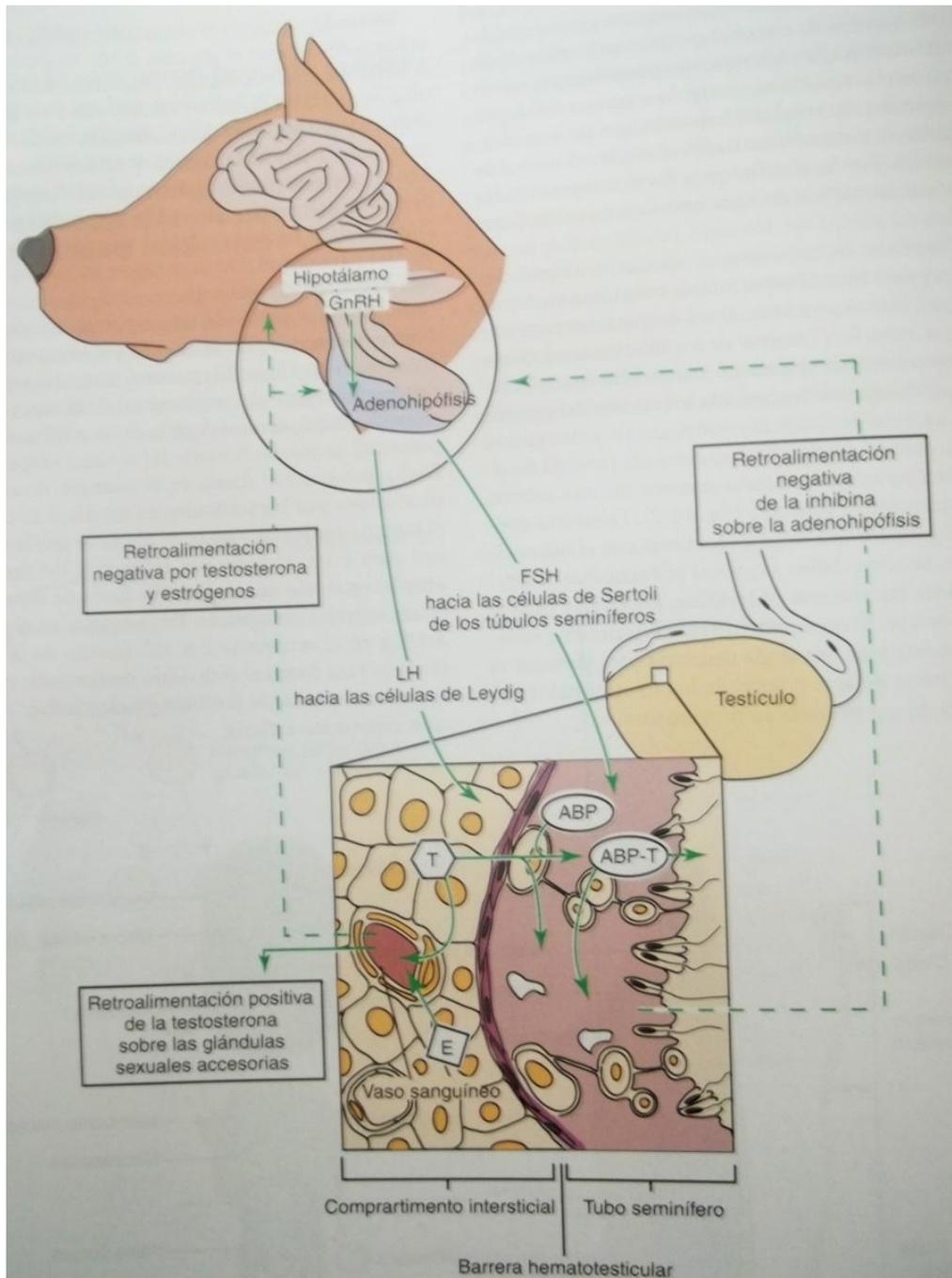


Figura 4. Eje hipotálamo-hipófisis-gonadal.
(Cunningham JG, 2009).

Este proceso tiene lugar en los túbulos seminíferos del parénquima testicular. Para la realización de la función espermatogénica se necesitan dos grupos celulares diferentes: las espermatogonias (células germinativas) y las células de Sertoli. Este proceso está estimulado por la adenohipófisis, que por influencia de factores liberados del hipotálamo, secreta dos hormonas: la FSH y la LH. La hormona folículo estimulante (FSH) es la que comienza el proceso de espermatogénesis en todos los machos y la hormona luteinizante (LH) es la que lo mantiene (Aguera, 2005).

Por lo general la espermatogénesis se divide en tres procesos principales: espermatocitogénesis, meiosis y espermiogénesis (Figura 5).

1. Espermatocitogénesis: En esta fase las espermatogonias inician un periodo de divisiones mitóticas, pasan de espermatogonias tipo A a espermatogonias tipo B. Y donde a partir de las cuales se va a llegar a la formación de los espermatocitos primarios.

2. Meiosis: La meiosis es una división reduccional del material genético a partir de dos divisiones celulares sucesivas. En la primera división meiótica cada espermatocito primario se va a dividir en dos espermatocitos secundarios. Al cabo de 2-3 días tiene lugar una segunda división meiótica donde cada espermatocito secundario da lugar a dos espermátidas, que son haploides. Cada espermátida definitiva lleva únicamente la mitad de los genes de la espermatogonia original.

3. Espermiogénesis: Esta fase ocurre justo antes de que las espermátidas se liberen a la superficie luminal de los túbulos seminíferos como espermatozoides (espermiación) (Cunningham y Bradley, 2009). Cada espermátida permanece en la zona de las células de Sertoli, nutriéndose y cambiando de forma, diferenciándose lentamente en un espermatozoide. Los cambios que se dan en la espermátida son: formación del acrosoma a partir del aparato de Golgi, pérdida de parte de su citoplasma, reorganización de la cromatina de su núcleo que forma una cabeza compacta y recolección de material citoplasmático restante y de las membranas celulares en uno de los extremos para formar una cola. Una vez formados los espermatozoides se da la espermiación, proceso por el cual la célula de Sertoli libera a los espermatozoides a la luz del tubo seminífero (Aguera, 2005 y Bielli, 2002).

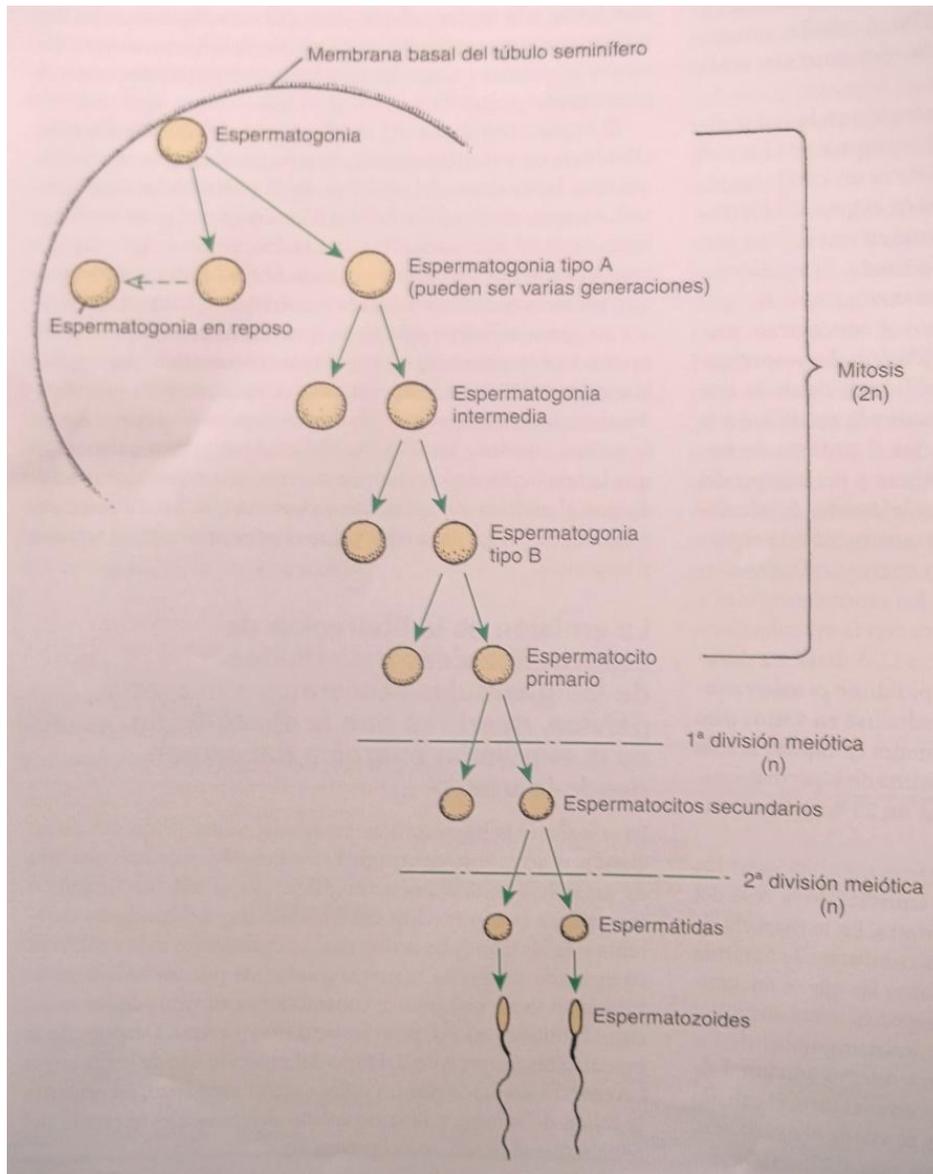


Figura 5. Espermatogénesis.
(Cunningham JG, 2009).

Luego de la espermiación, dicha célula no es capaz aún de fecundar un gameto femenino. Dicha capacidad la adquiere durante su transporte a lo largo del epidídimo, un proceso que se denomina maduración espermática de los espermatozoides. Cuando los espermatozoides abandonan el epitelio germinal son transportados mediante el flujo de secreción y el peristaltismo de los canalículos testiculares, a lo largo de la red testicular y los conductos eferentes hasta llegar al epidídimo. En el epidídimo se dan cambios progresivos (maduración espermática), que van a determinar entre otras cosas: potencialidad de desarrollar motilidad progresiva, condensación de la cromatina del núcleo y modificación del acrosoma, estabilización de proteínas estructurales por doble enlace (puentes disulfuro), cambios de superficie en la membrana plasmática, y migración de la gota citoplasmática de proximal a distal. Luego, el almacenamiento se da en la porción terminal del epidídimo y puede considerarse

que los espermatozoides están prontos para continuar su tránsito hacia el conducto deferente y la ampolla del deferente (Gil, 2002).

Teniendo en cuenta el tiempo del tránsito por el epidídimo, la duración de todo el proceso desde la espermatocitogénesis hasta los espermatozoides eyaculados, es de alrededor de 50 a 60 días para el perro (Cunningham y Bradley, 2009).

Los factores hormonales que estimulan la espermatogénesis, como ya se mencionaron algunas de las hormonas son: testosterona, FSH, LH, estrógenos y hormona del crecimiento. Los estrógenos formados por las células de Sertoli, por estímulo de la FSH, ayudan también al proceso de la espermiogénesis, y la hormona del crecimiento fomenta de manera específica la división temprana de las propias espermatogonias (Aguera, 2005).

También hay factores exógenos que afectan la espermatogénesis, entre ellos agentes nocivos, variaciones estacionales, posición escrotal, y temperatura (Aguera, 2005).

4.4 Espermatozoides

El espermatozoide se compone de cabeza y cola. A su vez en la cola, se distinguen cuello y piezas media, principal y terminal (Figura 6).

Cabeza: En la cabeza se distinguen núcleo, acrosoma (casquete cefálico) y la región postacrosómica. El núcleo está formado por la cromatina altamente compactada muy estable que transporta la mitad del material genético (haploide). La recubre una membrana nuclear doble. El acrosoma, que es originado en el aparato de Golgi, se puede definir como un gigantesco lisosoma o vesícula de doble pared que se sitúa a modo de capucha en el extremo anterior de la cabeza (Gil, 2002). El acrosoma contiene enzimas hidrolíticas y proteolíticas, que son liberados durante la reacción acrosómica por espermatozoides capacitados, en el tubo uterino. La base del núcleo está rodeada por la vaina postacrosómica, que consiste en proteínas fibrosas ricas en azufre. (Dellman y Wrobel, 1993).

Cuello: Es una estructura relativamente corta y estrecha entre la cabeza y la pieza media. Consta de un centriolo localizado centralmente y nueve gruesas fibras periféricas, orientadas longitudinalmente y que se continúan con las fibras exteriores de la pieza media (Dellman y Wrobel, 1993).

Pieza media: El centro de la pieza media tiene la estructura característica de un flageno: dos microtúbulos centrales y nueve parejas de microtúbulos periféricos (el axonema). Los microtúbulos están rodeados por nueve fibras exteriores en forma de huso, orientadas longitudinalmente y que se continúan con las fibras del cuello. Estas fibras, a su vez, están rodeadas por mitocondrias dispuestas según un patrón helicoidal. Un engrosamiento en forma de anillo de la membrana plasmática (anulus) de la pieza media señala el límite entre ésta y la pieza principal (Dellman y Wrobel, 1993).

Pieza principal: Es la porción más larga del espermatozoide. Tiene una estructura idéntica a la pieza media y está rodeada por las fibras exteriores que son continuación de las de la pieza media (Dellman y Wrobel, 1993).

Pieza terminal: El final de la vaina fibrosa marca el inicio de la pieza terminal, que contiene solamente el axonema axial (Dellman y Wrobel, 1993).

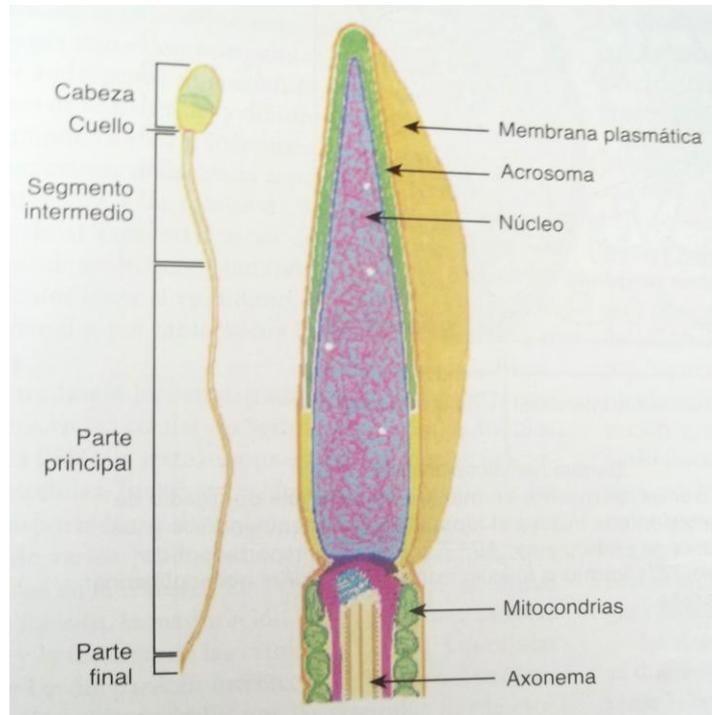


Figura 6. Partes principales del espermatozoide del mamífero. (Cunningham JG, 2009).

Las dimensiones del espermatozoide canino son las siguientes: longitud total $68 \pm 0,3 \mu\text{m}$, longitud de la cabeza $7 \mu\text{m}$, ancho de la cabeza $5 \pm 0,1 \mu\text{m}$, longitud de la pieza intermedia $11 \pm 0,2 \mu\text{m}$ y longitud de la cola $50 \pm 0,2 \mu\text{m}$ (Peña, 2006).

4.5 Semen canino

El semen eyaculado se compone de los espermatozoides suspendidos en el plasma seminal. En el perro, el volumen eyaculado va desde 2-15 ml. El semen canino es eyaculado en tres partes. La primera, clara y sin espermatozoides, se libera antes de alcanzar la erección completa. La segunda se eyacula coincidiendo con la reacción intensa de eyaculación; es ésta la parte en que van los espermatozoides. La tercera es un fluido claro que se eyacula mientras los animales están trabados (Cole y Cupps, 1984) (Tabla 1). Cada una de estas fracciones se eyacula en un momento determinado del servicio. La fracción preespermática se eyacula en la fase de cortejo, la fracción espermática

en el momento en que se observan los movimientos de empuje y la prostática en el “abotonamiento” (Stornelli, 2003).

Tabla 1. Características del eyaculado canino.
(Sorribas, 1999).

FRACCIÓN	NOMBRE	ORIGEN	CARACTERIS.	VOLUMEN	DURAC.
Sin espermatoz.	Preespermática	Prostático	Acuosa, transparente	1 ml (0,25-2,8)	30-50 segundos
Rica en espermatoz.	Espermática	Epidídimo	Viscosa, color gris o blanco lechoso	0,6 ml (0,4-2)	50-80 segundos
Sin espermatoz.	Prostática	Prostático	Acuosa, transparente	4 ml (1-17)	3-30 minutos

La eyaculación es la expulsión enérgica de semen de la uretra producida por un reflejo parasimpático sacro que induce contracciones rítmicas de los músculos bulboesponjoso, isquiocavernoso y uretral. Después de la eyaculación, el aumento del tono del músculo liso de los cuerpos cavernosos mediado por un reflejo sacral simpático, incrementa la salida de sangre, y la contracción del músculo retractor del pene retrae el pene hasta el prepucio (Cunningham y Bradley, 2009).

La porción líquida del eyaculado se denomina plasma seminal. Está constituido por la secreción de las glándulas accesorias (ampolla del conducto deferente y próstata, solo en el perro). Así como una minúscula porción porcentual de productos de secreción del epidídimo (Peterson y Aurich, 2005). Los diferentes productos del plasma seminal no se limitan a un mismo origen o glándula. Tiene una gran variación entre especies, entre individuos dentro de una misma especie, y además se presentan variaciones estacionales que son más evidentes en las especies de reproducción estacional. Los iones más frecuentes en el plasma seminal son el sodio y el potasio. Otros componentes son las prostaglandinas (E y F), enzimas (fosfolipasas, fosfatasa, etc.), otras proteínas asociadas a la fertilidad como osteopontina, péptidos y aminoácidos, fosfolípidos por ejemplo colina, lípidos (colesterol, testosterona, etc.), carnitina, ácido láctico, ascórbico, etc. Otros componentes con actividad antimicrobiana como inmunoglobulinas A, y con actividad hormonal como andrógenos, estrógenos, LH, relaxina, etc. (Gil, 2002) (Tabla 2).

Tabla 2. Algunos detalles en la composición del semen en el perro.
(Cole y Cupps, 1984).

SEMEN	
Volumen (ml)	2-15
Peso seco (%)	3,8
PLASMA SEMINAL	
Proteínas (g/100ml)	2,1
Fructosa (mg/100ml)	<1
Sorbitol (mg/100ml)	<1
Glicerilfosforilcolina (mg/100ml)	180 (Semen Total)
Sodio (mmoles/L)	114
Potasio (mmoles/L)	8,1
Calcio (mmoles/L)	0,35
Magnesio (mmoles/L)	0,25
Cloruro (mmoles/L)	152
Bicarbonato (mmoles/L)	2,9 (Semen Total)

4.5.1 Extracción de semen en el perro

La recolección del semen en la especie canina debe de observar una serie de requisitos indispensables para asegurar el éxito de la operación. El sitio en el que se lleva a cabo debe ser un lugar tranquilo, en el cual el macho no se muestre nervioso ni distraído. Se debe impedir que el animal orine inmediatamente antes de la recolección para evitar que la presencia de orina en la uretra pueda contaminar el semen (Sorribas, 1999).

Existen varios métodos para la extracción, el que se describe a continuación, el método de la “mano enguantada”, es el más usado, sencillo y de bajo costo. Otros son la electroeyaculación, la recolección con vagina artificial o con cono de látex. Por lo general se requiere la presencia de una hembra, si se encuentra en celo mejor, para la provocación del macho y favorecer la producción de una elevada cantidad de espermatozoides. Si la hembra no está en celo se le puede frotar en su cuarto posterior secreciones de hembras en estro o feromonas artificiales, para así excitar al macho.

El método de la “mano enguantada” requiere estimulación manual, el glánde parcialmente en erección como consecuencia de la estimulación sexual de la hembra en celo, se extrae con la mano izquierda del prepucio que lo envuelve y, haciéndolo alrededor por abajo, se le aplica masaje hasta que se perciba una clara separación entre en glánde y el bulbo del glánde. Cuando la reacción es buena, el perro comienza además a realizar fuertes empujes con la región pélvica, como ocurre en el apareamiento natural. Luego, corriendo hacia atrás el prepucio, se extiende hacia delante el glánde, que ha aumentado mucho su perímetro con gran rapidez. Por lo general la eyaculación de la fracción rica en espermatozoides (lechosa, blanquecina) coincide con la completa erección del pene y se recoge con un vaso graduado. En la mayoría de los casos el perro se eleva durante la eyaculación de la fracción rica en espermatozoides, levantando una extremidad posterior. Después, manteniendo la sujeción a nivel del cuerpo del pene, el glánde se desvía mediante ligera tracción, primero

lateralmente entre las dos extremidades posteriores del macho en dirección caudal, tal como sucede en el apareamiento natural. Cuando la relajación súbita del miembro anuncia la conclusión del “apareamiento” puesto en marcha para obtener el semen, se anula inmediatamente la fijación del pene (Günzel-Apel, 2010).

La muestra se mantendrá caliente, debe permanecer a 37°C, el enfriamiento provoca una reducción de la motilidad y el “shock por frío” de los espermatozoides, poco frecuente en el semen del perro (Allen, 1993).

Una vez recolectado, el semen se puede utilizar directamente para realizar una inseminación, maniobra que se conoce como inseminación con semen fresco sin diluir. O puede ser almacenado o refrigerado a 5-10 °C, manteniendo la viabilidad de los espermatozoides durante un lapso de 18-21 horas, o puede congelarse (Sorribas, 1999).

4.5.2 Evaluación seminal

El análisis del semen es necesario por varias razones, para confirmar la espermatogénesis normal en un perro joven antes de comenzar a usarlo como semental, como parte de cualquier programa de inseminación artificial, en casos de infertilidad, para comprobar la producción de semen tras una enfermedad o terapia con fármacos y para investigar el efecto de la enfermedad prostática sobre la calidad del semen (Allen, 1993). El semen de baja calidad se relaciona no solo con bajas tasas de preñez sino también con producción de camadas de bajo número de cachorros (Stornelli, 2003).

La evaluación debe ser macro y microscópica.

4.5.2.1 Macroscópica

Es la que se evalúa a simple vista, incluye volumen, color y pH.

Volumen: Varía según la raza, edad, tamaño, clima, etc. También se ve una variación con la cantidad recolectada de la tercera fracción. El volumen debe registrarse antes de eliminar ninguna muestra; este valor se necesita para calcular el número total de espermatozoides en el eyaculado (Threlfall, 2005) (Tabla 3).

Color: El semen normal es de color blanco lechoso. El color y la opacidad de la muestra de semen debe observarse inmediatamente después de la recolección. El color rojo indica la presencia de sangre, ya sea de la superficie del pene o de la próstata. El color amarillo indica la presencia de orina y partículas blancas pueden ser indicativas de la presencia de leucocitos (Threlfall, 2005).

pH: El pH normal del semen canino oscila entre 6,3-7 y depende de la cantidad de líquido prostático recolectado. Una disminución en el pH podría indicar una eyaculación incompleta o una inflamación de testículos o epidídimos (Sorribas, 1999).

4.5.2.2 Microscópica

Se evalúa motilidad, morfología y concentración espermática.

Motilidad: Se determina colocando una gota de semen en un portaobjetos y se examina bajo microscopio a 100x-200x aumentos. Se debe analizar la dirección y la velocidad del movimiento de los espermatozoides. Los movimientos circulares son indeseables y probablemente estén relacionados con una morfología anormal (Threlfall, 2005). La presencia de orina, pus, sangre, variaciones de temperatura, desinfectantes o lubricantes alteran la motilidad espermática (Sorribas, 1999). El porcentaje normal de espermatozoides moviéndose hacia adelante rápidamente en línea recta es del 70% o superior.

Morfología: Se estudia colocando una gota de colorante con una gota de semen, y se realiza un frotis sobre un portaobjetos, al que luego se le coloca un cubreobjetos y se observa bajo microscopio. El colorante específico para la observación de la morfología de los espermatozoides es la eosina-nigrosina, aunque también se pueden emplear otros colorantes como Wright, Giemsa y también tinta china. Un semen normal debe tener un mínimo de 80% de espermatozoides morfológicamente normales. Las anomalías se pueden clasificar según la ubicación del defecto, y pueden ser primarias (alteraciones que ocurren durante la espermatogénesis) o secundarias (anomalías que ocurren durante la maduración espermática epididimal o tras la eyaculación) (Sorribas, 1999). En la especie canina, los defectos espermáticos primarios que se sabe que están asociados a infertilidad son gotas citoplásmicas proximales, defectos del cuello y defectos de la pieza intermedia. Aunque los defectos secundarios, por ejemplo piezas intermedias plegadas o colas dobladas o enrolladas, se consideran menos graves que los primarios, ya que normalmente representan una respuesta transitoria frente a un estrés puntual, es obvio que si afectan a una gran proporción de los espermatozoides del eyaculado van a comprometer la motilidad y la fertilidad (Peña, 2007).

Anomalías comunes según la región del espermatozoide afectado: (Allen, 1993)

Anomalías de la cabeza: acrosomas desprendidos (indican capacitación precoz), acrosomas protuberantes, defecto de cráter (no se han formado correctamente las partes del ADN en la cabeza).

Anomalías en el cuello: cuello torcido, cuello roto (ambos pueden aparecer como consecuencia de una manipulación brusca de la muestra).

Anomalías en la pieza media: gota citoplásmica proximal (son abultamientos lisos unilaterales, son restos del citoplasma de la célula precursora del espermatozoide), unión al cuello (mitocondrias alteradas).

Anomalías en la cola: gota citoplásmica distal (representa la emigración de la gota proximal y suele ser aceptado como normal), cola torcida, cola enrollada.

Concentración espermática: Se denomina concentración espermática al número de espermatozoides/ml de semen. En un eyaculado normal existen de

200 a 1000 millones de espermatozoides/ml. En el caso de semen fresco para inseminación artificial se necesitan como mínimo 200 millones de espermatozoides/ml para fecundar a una perra, cuando es congelado es necesario una cantidad mayor debido a los que se pierden en el proceso de congelado y descongelado (Sorribas, 1999). El número total de espermatozoides varía enormemente entre las distintas razas, puesto que la producción espermática depende de la cantidad de parénquima testicular, y por tanto del tamaño testicular (Peña, 2007). La concentración se determina mediante una dilución de la muestra de semen al 1/100 con formol salino bufferado, ésto matará a los espermatozoides. Para el conteo se utiliza una cámara de Neubauer, donde se cuentan los espermatozoides en cinco cuadrados grandes, a ese número se lo multiplica por 10.000 y luego por el factor de dilución (que en este caso es 100). Se obtiene el número de espermatozoides por mm³ de semen, al que se lo debe llevar a espermatozoides por mililitro y luego multiplicarse por el volumen total del eyaculado. Para realizar el conteo, por lo general, se tienen en cuenta ciertos criterios: el conteo se realiza en cuadrados en zigzag, los espermatozoides aglomerados no se cuentan, las cabezas sueltas se cuentan como un espermatozoide, y aquellos que tocan los bordes izquierdos e inferior de cada cuadrado se cuentan, descartando los que están en contacto con los bordes derecho e inferior. De esta manera se evita contar dos veces una misma célula espermática que se encuentre en un límite.

Tabla 3. Valores y límites tolerables de los mismos de las características del eyaculado del perro, de acuerdo con el peso corporal. (Günzel-Apel, 2010).

Características del eyaculado	Peso Corporal (Kg)				
	≤ 10	11-20	21-40	41-60	≥60
Vol total (ml)	5-10	5-10	10-20	15-30	
Vol 2 ^a fracc (ml)	0,5-1	0,5-2	1-2	1-3	
Núm total esp.(×10 ⁶)	450	800	1200	1500	

Citología: Cuando aparecen en el semen células no espermáticas, éstas deben evaluarse mediante el uso de tinciones especiales ya que pueden relacionarse con enfermedades del aparato urogenital (Stornelli, 2003).

Análisis bioquímico: Los epidídimos son fuente de fosfatasa alcalina. Su medición se emplea como indicador del líquido epididimal presente en el eyaculado. Los perros azoospermicos con hipoactividad de fosfatasa alcalina seminal pueden tener obstrucción uni o bilateral de los epidídimos o una eyaculación incompleta (Stornelli, 2003).

En la Tabla 4 se muestran algunos parámetros seminales y su nomenclatura según su criterio de evaluación.

Tabla 4. Nomenclatura para análisis de semen.
(Ax y col., 2000).

PARÁMETRO	CRITERIO DE EVALUACIÓN	NOMENCLATURA
Volumen	Nulo	Aspermia
	Reducido	Hipospermia
	Aumentado	Hiperespermia
Concentración espermática	Cero	Azoospermia
	Reducido	Oligozoospermia
	Normal	Normozoospermia
	Aumentado	Polizoospermia
Motilidad espermática	Reducido	Astenozoospermia
Viabilidad espermática	Todos muertos	Necrozoospermia
Espermatozoides anormales	Alto porcentaje	Teratozoospermia

Tello y col. (1988), realizaron un estudio para evaluar algunas características seminales en caninos de raza Ovejero Alemán. (Tabla 5). Se estudiaron 100 eyaculados de 25 animales de raza Ovejero Alemán, cuyas edades fluctuaban de 1 a 5 años. Las muestras de semen se extrajeron mediante vagina artificial, una vez al mes durante el periodo otoño-invierno. Luego de la recolección cada eyaculado fue evaluado a través de métodos rutinarios. Los resultados promedio que se obtuvieron se representan a continuación.

Tabla 5. Valores promedio de las variables cuantitativas en el semen de canes Ovejero Alemán.
(Tello y col., 1998).

CARACTERÍSTICAS	PROMEDIO
Volumen (ml)	22,91
pH	7,04
Motilidad progresiva (%)	65
Concentración (10^6) espermatozoides /ml	870,45
Núm. Total de espermatozoides por eyaculado (10^9)	1,53

England (1999) determino la calidad seminal en distintas razas de perros. En perros Ovejero Alemán encontró que la segunda fracción del eyaculado era de mayor volumen que la de otras razas, al igual que el número total de espermatozoides eyaculados.

4.6 Mediciones testiculares

Las medidas testiculares, que son simples y baratas de obtener, han sido utilizadas para predecir la producción espermática y la calidad seminal.

La medición de la circunferencia escrotal es una medida indirecta de la capacidad de producción de semen de un macho. El tamaño testicular obtenido por medio de la circunferencia escrotal está altamente correlacionado de manera positiva con la producción total de espermatozoides, por lo que la circunferencia escrotal es una buena medida para conocer la capacidad de producción de los testículos. Para obtener una medición válida es necesario que los testículos sean normales, ya que algunas condiciones patológicas podrían hacer variar su tamaño. Para tomar la circunferencia escrotal en rumiantes, los testículos deberán desplazarse firmemente hasta la base de la bolsa escrotal midiéndose el diámetro mayor del escroto (Bustamante y Duchateau, 1991).

Son varios los autores que concuerdan que las mediciones escrotales son simples, baratas de obtener, y que se pueden utilizar para predecir la producción de espermatozoides y la calidad de semen en toros (Elmore y col., 1976, Coulter y Foote, 1979, Gipson y col., 1985, Bailey y col., 1996). Otros han reportado una correlación entre la circunferencia escrotal y el volumen del epitelio seminífero (Veeramachaneni y col., 1986). Thompson y Johnson (1995), plantean que las mediciones escrotales han sido recomendadas como un test clínico para evaluar la fertilidad potencial de toros jóvenes, pero la circunferencia escrotal está pobremente correlacionada con la fertilidad en pruebas de cruzamientos ya que la fertilidad se encuentra especialmente influida por muchos factores que no son evaluados al determinar la circunferencia escrotal.

Hahn y col. (1969), ya determinaron en toros jóvenes que la circunferencia escrotal era una mejor medida de talla testicular que otras medidas lineales, ésta variable es fácil de medir, tiene una alta repetibilidad ($r=0,98$) y está altamente correlacionada con el peso testicular. Pero parece ser de poco valor en toros de más de 5 a 6 años de edad, donde otros cambios en los testículos aparentemente enmascaran la relación de talla testicular y el potencial espermatogénico.

Fields y col. (1979), evaluó en distintas razas de toros características seminales y volumen testicular durante dos años sucesivos. Donde llegó a la conclusión de que la raza y los efectos del año eran muy significativos en el volumen testicular. En la raza Hereford se notó una reducción en el volumen testicular entre los meses de Abril y Agosto, esto se puede deber a la gran susceptibilidad de la raza a la humedad alta y a los efectos de la temperatura sobre los túbulos seminíferos.

También Coulter y Foote (1979), determinaron las medidas indirectas para medir el peso testicular en toros: la longitud y el diámetro del testículo, la anchura de los testículos emparejados, y la circunferencia escrotal.

Bailey y col. (1996), plantean en toros también, una posible relación entre la morfología testicular (largo y ancho) y la producción de semen.

Más adelante, Bailey y col. (1998), desarrollan una fórmula de un esferoide prolado, que determina un método rápido y altamente seguro para estimar el volumen y peso testicular a partir de las medidas de largo y ancho testicular. Hay una alta correlación entre los datos que predice con los datos reales. La ventaja de estas medidas, largo y ancho testicular, y su aplicación en

una fórmula matemática simple son claras. Esta fórmula utiliza medidas físicas de cada testículo individual, en comparación con la circunferencia escrotal que utiliza una única dimensión como medida sobre ambos testículos a la vez, y así ser consideradas para calcular el volumen y peso testicular total. La fórmula que predice el volumen de los testículos es $V=0,5236(L)(ATE)^2$, donde L=largo total de los testículos y ATE=ancho total del escroto, y la fórmula que predice el peso es $W=0,5533 (L)(ATE)^2$.

En cuanto a la especie canina, Olar y col. (1983), plantean que el ancho total de escroto es un buen predictor de fertilidad, determinaron una alta correlación entre el ancho total del escroto con el peso testicular, la producción diaria de espermatozoides y con la eyaculación diaria de espermatozoides.

Dahlbom y col. (1995), realizaron un estudio en Irish wolfhounds, los cuales tienen un tejido testicular más blando y una calidad del semen más baja que otras razas. En esta raza de perros no se encontró una correlación entre el ancho total del escroto y características seminales. Dos años después, en un estudio complementario, Dahlbom y col. (1997), querían determinar si los parámetros de fertilidad habían cambiado después de dos años. Los perros seguían mostrando una libido baja, testículos más chicos y blandos y una baja calidad seminal, lo que sugiere una degeneración testicular.

Asimismo, Subev y col. (1996), en su investigación con perros Ovejero Alemán, plantean que aquellos perros que presentan un Índice (calculado como el promedio del largo de ambos testículos y el epidídimo multiplicado por el ancho total del escroto) mayor a 18 cm tenían una mayor concentración espermática, lo que indica que tendrán una función de espermatogénesis comparativamente mejor que aquellos animales que muestren valores del índice menores a 18 cm.

En la raza Ovejero Alemán hay un estudio (Cortez y col., 2002), que determina la correlación entre el perímetro escrotal y la concentración espermática. Para medir el perímetro escrotal se llevan los testículos para la parte inferior del saco escrotal y se mide en la porción más larga del saco escrotal. Se encontró una baja correlación entre la concentración espermática y el perímetro escrotal en perros de raza Ovejero Alemán. Similares resultados fueron obtenidos por England (1991), según este autor el volumen testicular solamente se correlaciona significativamente con el total de espermatozoides eyaculados si los túbulos seminíferos ocuparan más de 2/3 del volumen testicular.

4.7 Estacionalidad

La bibliografía sobre este tema, estacionalidad reproductiva en el macho canino, es escasa, siendo más difundida en otras especies animales que tienen una estacionalidad reproductiva más marcada.

La actividad reproductiva estacional está controlada sobre todo por las variaciones de la duración de la luz diurna que provocan las estaciones. Existen especies animales cuya actividad reproductiva aparece cuando la duración de la

luz diurna se reduce (por ej., oveja y cabra) o cuando va aumentando (por ej., caballo, hámster). Con respecto a la manifestación de las variaciones estacionales de las funciones reproductoras existen diferencias graduales tanto entre especies distintas como entre distintas razas de la misma especie. En las especies y razas de animales poco domesticadas los efectos de la periodicidad lumínica acostumbran a ser más marcados que entre los animales muy domesticados. En los machos de especies en que la estacionalidad reproductiva es muy marcada, cuando no están en época de apareamiento, puede producirse una importante regresión testicular. La espermatogénesis y la síntesis de andrógenos se detienen casi por completo, las glándulas sexuales accesorias se atrofian y los animales quedan infértiles. Por el contrario, en las razas y especies con comportamientos reproductores estacionales menos marcados, como los caballos machos, las variaciones de la actividad reproductiva provocadas por la duración de la luz diurna no son tan marcadas. Fuera de la estación reproductora en este caso se produce una cierta reducción de la síntesis de andrógenos y de la espermatogénesis, si bien los machos son fértiles durante todo el año. El grado de manifestación del comportamiento reproductor estacional controlado por la duración de la luz diurna también está influido por otros factores ambientales como el clima o la disponibilidad de alimentos (Peterson y Aurich, 2005).

La estacionalidad de la reproducción es un proceso fisiológico de adaptación utilizado por los animales salvajes para enfrentarse a los cambios estacionales en su entorno, y en especial, a la disponibilidad de alimento. El fotoperiodo es el principal factor medioambiental que determina el inicio y la duración de las estaciones reproductivas. La localización temporal de la estación reproductiva depende de la duración del periodo de gestación, para así asegurarse de que el parto se dará cuando haya mayor disponibilidad de alimento. En cuanto al carnero, entre los factores medioambientales que pueden reducir la eficiencia reproductiva, la temperatura elevada parecería ser el más importante. Y con respecto al caballo la producción de espermatozoides se ve influida por varios factores, entre los que se encuentran la estación, el tamaño de los testículos, la frecuencia de las eyaculaciones y la edad. Estudios han demostrado una mejor calidad espermática en primavera y verano, que en otoño e invierno (Gordon, 2006).

En el carnero el peso testicular evoluciona en sentido inverso a la duración de las horas de luz, siendo máxima en otoño. Las variaciones estacionales estimulan la actividad sexual de un mes a un mes y medio antes en los carneros que en las ovejas (Fernández, 1995). Se ha comprobado que durante los días largos de primavera y principios de verano la producción de semen es inferior, no solo en cantidad sino también en calidad por la presencia de espermatozoides anormales incapaces de fecundar. Las altas temperaturas afectan los distintos estadios de la espermatogénesis, producen una reducción del peso testicular y disminuyen la eficiencia en la síntesis de testosterona (Fernández, 1987).

La perra se considera monoéstrica estacional, ya que solo tiene un celo por estación reproductiva. A pesar de que existen diferencias en cuanto a la estacionalidad, en la mayoría de los individuos se observa la estación

reproductiva en primavera y otoño. Algunos investigadores han encontrado que el estro se encuentra durante todo el año, otros destacan que aparece en algunos meses puntuales del año (Fila y Berglavaz, 2002).

La estacionalidad en las especies caninas ha sido un tema en constante desacuerdo por muchos años entre los autores. La estacionalidad es un atributo de cánidos silvestres como lobos (*Canis lupus*), coyotes norteamericanos (*Canis latrans say*), perros salvajes (*Canis azore*, como por ejemplo el perro Dingo Australiano), así como la raza Basenji dentro de los perros domésticos (*Canis familiaris*). El lobo, el coyote del norte y el perro salvaje muestran el estro durante el invierno. El perro Basenji entra en el estro durante un período limitado en otoño (Bouchard y col., 1991). Bouchard y colaboradores (1991) realizaron un trabajo con 67 perras de 5 razas diferentes durante 4 años, y donde al acumular los datos analizados de todos los años se encuentra una distribución estacional en invierno y verano; lo que no se manifiesta en los años evaluados independientemente.

En el perro, las concentraciones espermáticas son más altas en primavera. La libido, la motilidad y la concentración de testosterona no son afectadas por la estacionalidad (Taha y col., 1981). Estos investigadores (Taha y col., 1981), en su estudio, encontraron una marcada influencia estacional en la concentración espermática de la segunda fracción eyaculada, en la cantidad total diaria de espermatozoides y en la concentración de glicerilfosforilcolina, con picos a finales de la primavera y a principios de verano, y valores más bajos a finales de verano y principio de otoño.

Otros autores, Ortega-Pacheco y col. (2006), realizaron estudios en perros machos en condiciones tropicales para determinar variaciones estacionales en características seminales, ancho del escroto, concentración en suero de prolactina y testosterona. El año se lo dividió en tres estaciones, caliente-seco (marzo a junio), caliente-húmedo (julio a octubre) y húmedo-fresco (noviembre a febrero). Se demostró que con respecto a la concentración de testosterona no se encontraron cambios estacionales, las variaciones en el ancho testicular están reflejadas en la producción diaria de esperma y en la reserva epididimal. El ancho del escroto, el volumen eyaculado y la concentración y motilidad espermática fueron considerablemente más bajas en la estación húmedo-fresco.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Estimar la utilidad de tres diferentes métodos para determinar el volumen testicular (Ancho Total del Escroto, Índice y Fórmula Matemática) en relación al número total de espermatozoides y la concentración del eyaculado muestreado, así como su variación estacional, edad y peso de los animales muestreados, en las condiciones de investigación en nuestro país.

5.2 Objetivos Específicos

- 1) Determinar la relación entre mediciones testiculares y el número total de espermatozoides y la concentración del eyaculado muestreado.
- 2) Determinar la relación entre el número total de espermatozoides, la concentración del eyaculado muestreado y las diferentes estaciones del año.
- 3) Determinar la relación entre el número total de espermatozoides y la concentración del eyaculado muestreado con respecto a la edad y el peso.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron 22 machos de la raza Ovejero Alemán. Los perros pertenecían al Plantel de Perros de la Policía de Montevideo. Fueron elegidos como raza de investigación debido al amplio estudio internacional. Las características de selección para los machos fueron: un mínimo de 18 meses al inicio del estudio, dos testículos descendidos, y sin observaciones al examen clínico general. Los machos que presentaron una asimetría superior al 25% entre ambos testículos al examen testicular, no se consideraron. Todos los machos fueron pesados en forma previa a la evaluación.

Estacionalidad

La evaluación de los animales seleccionados, tanto testicular como de semen, se realizó durante un año. Los muestreos se llevaron a cabo en las cuatro estaciones marcadas: otoño (marzo-abril), invierno (junio-julio), primavera (setiembre-octubre) y verano (diciembre-enero).

Examen Testicular

Previo a la colección de semen, el escroto y los testículos fueron palpados. La medición de los testículos se realizó con un calibre. Por este medio se midió el ancho total del escroto (ATE), el largo total de ambos testículos juntos y el largo de ambos testículos por separado, incluyendo los epidídimos. La misma persona (el orientador) examinó a todos los perros (Dahlbom y col., 1995).

En base a los datos de estas medidas se establecieron tres alternativas para calificar a los machos:

1) El ATE (Olar y col., 1983).

2) Un índice que caracteriza el desarrollo testicular mediante la fórmula: $I = (L_d + L_i) / 2 \times ATE$, (L_d y L_i son el largo del testículo derecho y del izquierdo más epidídimo) (Subev y col., 1996). Teniendo en cuenta lo descrito por Subev y colaboradores (1996), a los índices mayores a 18 se les asignó la categoría 1 y a los menores a 18 la categoría 2.

3) Una fórmula que predice el volumen de los testículos $V = 0,5236 (L)(ATE)^2$, como un esferoide prolado (L es el largo total de los testículos) (Bailey y col., 1998).

Colección de semen

Se tomaron un total de cuatro muestras por animal en el año de estudio, con abstinencia sexual de por lo menos un mes (Rota y col., 1998). El semen fue colectado por manipulación digital y siempre por la misma persona. Se colectó dentro de un vaso colector de vidrio graduado y precalentado.

La persona que realizó la colección de semen se posicionó agachada del costado izquierdo del perro, el cual se encontraba reducido en sus movimientos.

Se colocó una mano enguantada estimulando por masaje manual a través del prepucio. Cuando se logró una semierección, se desplazó hacia caudal el prepucio, dejando libre el bulbo del glande donde se realizó presión para completar el estímulo. Posteriormente se dobló el pene de manera semejante a lo que ocurre cuando el mismo se encuentra abotonado, posicionándonos con una mano entre los miembros posteriores (Linde-Forsberg, 1991). La primer fracción de semen proveniente de la próstata se descartó, para conservar y evaluar la segunda fracción rica en espermatozoides (0,5 a 3 ml). Ésta debe fue colectada por completo junto con la pequeña parte de la tercera fracción para tener la seguridad de colectarla en forma completa, ya que la transición de estas dos últimas fracciones no es lo suficientemente evidente (Dahlbom y col., 1995).

Evaluación de semen

Se registró macroscópicamente los siguientes parámetros: volumen, aspecto, color y pH de la fracción extraída de cada eyaculado. Microscópicamente se registró el porcentaje de motilidad en masa y el vigor (con un score de 0 a 5, de nada a máximo de vigor), estos parámetros fueron evaluados de inmediato en un microscopio de contraste de fase Nikon Labophot, a 200x de magnificación y a 37°C.

La motilidad progresiva individual rectilínea a través del campo fue evaluada a 400x de la misma manera, diluyendo la muestra en suero fisiológico o diluyente isosmótico.

En el laboratorio la concentración espermática se estableció utilizando una cámara de Neubauer. Se calculó el número total de espermatozoides por eyaculado. Esto anterior fue evaluado según la técnica descrita por Silva y col. (2003). Una alícuota se diluyo con formol salino bufferado para el examen de la morfología celular. Las anomalías espermáticas y el porcentaje de vivos y muertos fueron determinados usando una coloración de eosina-nigrosina, según el método descrito por Blom, mencionado por Bane (1983).

Estadística

Para el análisis de los datos se realizaron evaluaciones con el test de varianza (ANOVA), comparando los parámetros seminales evaluados (concentración y número total de espermatozoides) con las mediciones testiculares, la edad, el peso y las estaciones del año. También se realizaron correlaciones entre cada una de las mediciones calculadas con el número total de espermatozoides y la concentración del eyaculado muestreado.

Para el procesamiento de los datos seminales se dividieron a los animales en dos categorías tanto para edad y peso. Para la variable edad se dividieron los animales en dos grupos, en el 1(m5) colocamos los animales con una edad entre 18 a 60 meses (menores a 5 años), y en el 2 (M5) colocamos los animales entre 61 hasta 117 meses (mayores de 5 años). Con respecto al peso, en el nivel 1 (m35) se ubicaron los animales entre 29 y 34 kg, y en el 2 (M35) ubicamos los que pesan entre 35 y 44 kg de peso vivo.

7. RESULTADOS

En primer lugar se presenta a continuación, la estadística descriptiva de los datos del muestreo realizado. La edad, peso y las mediciones testiculares de los 88 muestreos de los animales se pueden observar en la Tabla 6. Los diferentes parámetros de la evaluación seminal de las 81 colectas de semen realizados, como ser volumen, pH, motilidad microscópica de masa e individual, vigor, morfología, V/M, concentración y N^o Total de espermatozoides se observan en la Tabla 7. En dichos resultados se realizaron 4 mediciones testiculares sobre cada animal en todo el ensayo (88 mediciones) y se tomaron 81 valoraciones del eyaculado de los perros, ya que en determinadas situaciones no se pudo colectar en una estación y en otra sí. Esto último se debió a diferentes motivos como ser trastornos de comportamiento y lesiones o alteraciones prostáticas.

Tabla 6. Promedios y errores estándar de la edad, peso y mediciones testiculares.

	Edad(m)	Peso(kg)	ATE	I	V
Promedio	78,10	34,97	4,97	21,49	57,55
Error. Est.	5,23	1,88	0,81	2,32	4,58

ATE= Ancho Total del Escroto, I= Índice, V= Volumen, m= meses.

Tabla 7. Promedios y errores estándar de los parámetros seminales evaluados.

	Vol.	pH	Vigor	%MM	%MI	%V/M	Morf.	Conc.	N ^o T
Promedio	2,73	6,73	3,70	72,04	62,16	61,81	24,88	460,67	1264,47
Error.Est.	1,02	0,73	0,95	4,54	4,71	4,74	4,27	13,91	26,53

Vol.= Volumen (ml), %MM= % Motilidad Masa, %MI= % Motilidad Individual, %V/M= % Vivos y Muertos, Conc.= Concentración (mill/ml), N^oT= Número total de espermatozoides (mill).

La primera estación en la que se realizaron los muestreos fue otoño (marzo-abril), se muestrearon 22 animales con un promedio de edad de 74 meses \pm 27,8 y un peso promedio de 34,5 kg \pm 3,4. Con respecto al examen testicular se tomaron medidas testiculares para luego aplicar dos fórmulas y así obtener el ATE, un índice y el volumen (Tabla 8). La colección de semen fue exitosa en todos excepto en tres animales, de los cuales dos no eyacularon y se encontraron, mediante un tacto rectal y ecografía, alteraciones en la próstata con una asimetría marcada, el otro perro eyaculó solo la porción prostática. Uno de los perros que presentaba también la próstata aumentada y una asimetría prostática, eyaculó pero lo hizo con un color rojizo, y se encontró una lesión craneal en el testículo izquierdo con edema y dolor. Cuatro de ellos tenían el epidídimo izquierdo más grande, pero eyacularon normalmente. Los parámetros seminales que nos interesa analizar se detallan en la Tabla 9.

El segundo muestreo se llevó a cabo en invierno (junio-julio), los mismos 22 animales muestreados ahora presentaban una edad promedio de 77 meses \pm 27,9 y un peso promedio de 37 kg \pm 3,1. Para el examen testicular ver Tabla 8. De los animales, eyacularon todos menos uno, que al examen de próstata reveló una asimetría prostática y un aumento de tamaño de la próstata. El perro que en otoño había eyaculado un semen color rojizo, en esta ocasión eyaculó normal, pero continuaba con la lesión craneal en el testículo izquierdo, con edema y dolor. Los parámetros seminales se describen en la Tabla 9.

El tercer muestreo se efectuó en primavera (setiembre-octubre), los animales presentaban una edad promedio de 78,7 meses \pm 27,0 y un peso promedio de 36,2 kg \pm 3,1. Eyacularon todos excepto dos animales, que también reflejaron alteraciones prostáticas. El examen testicular se detalla en la Tabla 8 y los parámetros seminales en la Tabla 9.

El último muestreo corresponde a la estación de verano (diciembre-enero), los 22 animales presentaban una edad promedio al final del ensayo de 82,6 meses \pm 27,9 y un peso promedio de 32,2 kg \pm 2,6. Al examen testicular se obtuvieron las mediciones que se describen en la Tabla 8. Eyacularon todos los animales menos uno de ellos que al examen de próstata manifestaba una hiperplasia prostática benigna y el epidídimo izquierdo más grande. Uno de los perros presentaba una prostatitis, que coincidió con los parámetros microscópicos de concentración y motilidad más bajos. Parámetros seminales detallados en la Tabla 9.

Tabla 8. Promedios y errores estándar de las mediciones testiculares en las diferentes estaciones del año.

MEDIC.TESTIC.	OTOÑO	INVIERNO	PRIMAVERA	VERANO
ATE	4,9 \pm 0,8	5,0 \pm 0,8	4,9 \pm 0,8	5,0 \pm 0,8
I	21,1 \pm 2,6	21,5 \pm 2,3	21,4 \pm 2,3	21,9 \pm 2,3
V	56,4 \pm 4,8	57,4 \pm 4,5	56,9 \pm 4,5	59,5 \pm 4,6

ATE= Ancho Total del Escroto, I= Índice, V= Volumen.

Tabla 9. Promedios y errores estándar de los parámetros seminales analizados en las diferentes estaciones del año.

PARAMETROS SEMINALES	OTOÑO	INVIERNO	PRIMAVERA	VERANO
Conc. (mill/ml)	483,5 \pm 14,5	411,1 \pm 12,2	471,6 \pm 13,6	479,1 \pm 15,1
NºTde esp.(mill)	1421,7 \pm 29,3	1113,6 \pm 21,5	1365,7 \pm 27,3	1176,6 \pm 26,7

Al realizar los análisis estadísticos mediante el test de varianza (ANOVA) estudiamos varios efectos:

Estación: se utilizó como variable independiente, teniendo 4 categorías (otoño, invierno, primavera y verano). No se encontró diferencias significativas entre la estación del año y ninguno de los parámetros evaluados, ya sean seminales como mediciones testiculares.

Edad: la edad se tomó como una variable independiente también, teniendo 2 categorías ya descriptas.

Peso: al igual que en la edad se lo dividió en 2 niveles ya descriptos.

Índice: al ser considerado también, una variable independiente se lo dividió en 2 categorías ya descriptas.

La concentración y el número total de espermatozoides se utilizaron como variables dependientes. No se encontró significancia estadística de estos efectos ni estación, edad, peso o índice sobre los demás parámetros que se evaluaron (concentración y número total de espermatozoides).

Luego se realizaron las correlaciones entre las tres mediciones testiculares (ATE, I y V), y la concentración y el número total de espermatozoides; sin encontrar alguna diferencia significativa (Tabla 10).

Tampoco se encontraron correlaciones entre las medidas testiculares y ninguno de los otros dos parámetros seminales ($p < 0,05$).

Tabla 10. Correlaciones entre las medidas testiculares (ATE, I y V) y el Número total de espermatozoides y la Concentración.

Correlaciones	I	ATE	V
NºTotal de esp.	-0.46029880	-0.3731533	-0.43563075
Concentración	-0.08382764	-0.1167420	-0.09434951

ATE= Ancho Total del Escroto, I= Índice, V= Volumen.

8. DISCUSIÓN

Mediciones Testiculares

Los resultados de las mediciones testiculares (ATE, I y V) obtenidos, en general, no demostraron variaciones significativas entre las estaciones del año.

Como ya se mencionó las mediciones testiculares han sido utilizadas para predecir la producción espermática y la calidad seminal. Son varios los trabajos realizados en otras especies, sobretodo en toros (Elmore y col., 1976, Coulter y Foote, 1979, Gipson y col., 1985, Bailey y col., 1996).

En la especie canina Olar y col. (1983), encontraron que el ATE es un buen predictor de la fertilidad, determinando una alta correlación entre el ancho total del escroto con el peso testicular, la producción diaria de espermatozoides y la eyaculación diaria de espermatozoides. En este trabajo no se encontró una correlación estadística significativa entre las tres medidas testiculares y la concentración, ni el número total de espermatozoides.

Otra medida testicular evaluada fue el Índice, donde los resultados revelaron un valor promedio entre las estaciones de $21,49 \pm 5,39$. Esta medida fue determinada en perros de raza Ovejero Alemán por Subev y col. (1996), y se encontró que los perros que tenían un índice mayor a 18 presentaban una mejor producción espermática (en particular, concentración de semen). En este trabajo de los 22 animales muestreados solamente 9 tuvieron índices menores a 18, de los cuales 2 animales repiten esos valores más bajos en las cuatro estaciones.

La otra fórmula, el volumen, desarrollada por Bailey y col. (1998), en toros, es un muy buen predictor de la fertilidad. Debido a que la fórmula se utilizó en toros no es posible comparar los valores obtenidos en ese ensayo con los obtenidos en este trabajo; pero no se encontraron grandes diferencias entre los volúmenes promedios de las estaciones.

Cortez y col. (2002), determinaron la correlación entre el perímetro escrotal y la concentración espermática. Se encontró una baja correlación entre la concentración espermática y el perímetro escrotal en perros de raza Ovejero Alemán. Similares resultados fueron obtenidos por England (1991), según este autor el volumen testicular solamente se correlaciona significativamente con el total de espermatozoides eyaculados si los túbulos seminíferos ocuparan más de $2/3$ del volumen testicular. En este trabajo no se midió el perímetro escrotal como tal, por lo tanto no se puede afirmar si hay correlación o no con la concentración.

En base a los análisis anteriormente expuestos, en primera instancia podemos determinar que, en nuestro trabajo no encontramos de utilidad las mediciones testiculares como predictor de la calidad seminal, y por lo tanto de la fertilidad.

Parámetros Seminales

De todos los parámetros testeados nos centramos en la concentración espermática (millones de espermatozoides/ml) y en el número total de

espermatozoides eyaculados en la segunda fracción, ya que son considerados como mejores indicadores para evaluar la fertilidad en un perro.

Taha y col. (1981), encontraron una marcada influencia estacional en la concentración espermática de la segunda fracción eyaculada y en la cantidad total diaria de espermatozoides, siendo más altas a finales de la primavera y a principios de verano y más bajas a finales de verano y principio de otoño. Se utilizaron solamente 5 perros de la raza Beagle, se los mantuvo en caniles donde estaban sujetos a la variación estacional en la luz y la temperatura, el ensayo fue realizado en Inglaterra. En este trabajo la concentración tuvo un descenso numérico en invierno, que no presentó diferencias estadísticas significativas. Cabe destacar que la estacionalidad varía según muchos factores como la latitud, el país, el número de animales, la raza, etc.

Ortega-Pacheco y col. (2006), realizaron estudios en perros machos en condiciones tropicales para determinar variaciones estacionales en características seminales, ancho del escroto, concentración en suero de prolactina y testosterona. El año se lo dividió en tres estaciones, caliente-seco (marzo a junio), caliente-húmedo (julio a octubre) y húmedo-fresco (noviembre a febrero). Las variaciones en el ancho testicular están reflejadas en la producción diaria de esperma y en la reserva epididimal. El ancho del escroto, el volumen eyaculado y la concentración y motilidad espermática fueron considerablemente más bajas en la estación húmedo-fresco (noviembre a febrero). Estos parámetros en este trabajo no se vieron afectados de la misma manera.

En el número total de espermatozoides se observó un leve descenso en verano e invierno. Estos cambios se atribuyen a que en nuestro país tenemos estaciones definidas y en verano e invierno las condiciones de temperatura son extremas, un verano muy caluroso (35°C aprox.) y un invierno muy frío (5°C aprox.). Cabe destacar que las condiciones ambientales donde se encuentran alojados los animales podrían empeorar éstos valores de temperatura, haciéndolos más extremos. Por tales motivos los animales ante éstas condiciones disminuyen su producción total de espermatozoides. Pero estas diferencias numéricas no se vieron reflejadas y sustentadas en los análisis estadísticos. Estos arrojaron que no hay una correlación entre el número total de espermatozoides y la estación del año, por lo tanto, estadísticamente no hay diferencias significativas entre los valores y las cuatro estaciones del año.

Concentración y número total de espermatozoides también se compararon con la edad y el peso, ambos parámetros divididos en las 2 categorías descritas. Pero no se encontraron diferencias estadísticas significativas.

La no significancia estadística de ninguno de los parámetros evaluados entre sí y las correlaciones, se pueden atribuir, primero al n : el número de animales (n) era pequeño, si bien se trató de que el grupo fuera bastante homogéneo, de todas formas, había diferencias entre los animales. Las condiciones en que se encontraban los animales no eran condiciones adecuadas de investigación. Las limitaciones en la muestra podría ser el problema más importante en este trabajo.

9. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos, podemos concluir en cuanto a las mediciones testiculares que no se encontró una relación con el número total de espermatozoides y la concentración.

Con respecto al número total de espermatozoides y la concentración del eyaculado muestreado tampoco se vio una relación directa con la edad y el peso de los animales, así como una variación estacional de dichos parámetros.

No vimos de utilidad las mediciones testiculares para predecir la fertilidad de un perro y tampoco la concentración y el número total de espermatozoides, ya que estadísticamente no se constató ninguna variación de éstos parámetros ya sea entre si y en las cuatro estaciones evaluadas. Las limitantes, previamente citadas, nos ayudan a entender más sobre la no significancia de los valores.

Como opción para evitar estas limitantes nos plantearíamos ampliar el n , con un número de animales más representativo y tener dos grupos de animales de un n similar, con valores extremos en la calidad seminal, que pudieran permitir una mejor comparación de resultados y así poder acercarnos más al potencial reproductivo máximo en perros.

La escasa información generada en nuestro país sobre la fertilidad en caninos, y más aún en el Ovejero Alemán, con un criterio científico y la conveniencia de mejorar y acercarse al máximo potencial reproductivo fueron lo que motivó a la realización de dicho trabajo de tesis.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aguera S (2005) *Aparato genital masculino*. En: Garcia AG y col. *Fisiología Veterinaria*, Zaragoza, Interamericana McGraw Hill, pp. 969-986.
2. Allen WE (1993) *Valoración del semen*. En: Allen WE. *Fertilidad y obstetricia canina*. Zaragoza, Acribia, pp. 53-67.
3. Ax RL, Dally M, Didion BA, Lenz RW, Love CC, Varner DD, Hafez B, Bellin ME (2000) *Evaluación del semen*. En: Hafez B, Hafez ESE, *Reproducción e Inseminación artificial en animales*. México, Mc Graw Hill Interamericana, pp. 375-386.
4. Bailey TL, Monke DR, Hudson RS, Wolfe DF, Carson RL, Riddell G (1996) *Testicular shape and its relationship to sperm production in mature Holstein bulls*. *Theriogenology*, 46(5): 881-887.
5. Bailey TL, Hudson RS, Powe TA, Riddell MG, Wolfe DF, Carson RL (1998) *Caliper and ultrasonographic measurements of bovine testicles and a mathematical formula for determining volume and weight in vivo*. *Theriogenology*, 49(3): 581-594.
6. Bane A (1983) *Morfological evaluation on semen*. Proceeding XV FAO Postgraduate Course on Animal Reproduction, Sweden, 18p.
7. Bielli A (2002) *Regulación Hormonal de la función reproductiva en el macho*. En: Ungerfeld R, *Reproducción en los animales domésticos*. Montevideo, Melibea, V.1, pp. 79-92.
8. Bouchard G, Youngquist RS, Vaillancourt D, Krause JF, Guay P, Paradis M (1991) *Seasonality and variability of the interestrus interval in the bitch*. *Theriogenology*, 36(1): 41-50.
9. Bustamante G, Duchateau A (1991), *Examen de la salud reproductiva del macho*. En: Galina C y col. *Reproducción de animales domésticos*. México, Limusa, pp. 169-175.
10. Carlson BM (1990) *Citogenética y determinación sexual*. En: Carlson BM. *Embriología de los Animales Domésticos*. Zaragoza, Acribia, pp. 375-389.
11. Cole HH, Cupps PT (1984) *Reproducción de los Animales Domésticos*. Zaragoza, Acribia. 552p.
12. Concannon PW, Batista M (1986) *Canine semen freezing and artificial insemination*. En: Kirk RW, *Current veterinary therapy in small animals*. Philadelphia, Saunders, pp. 1247-1258.
13. Cortez AA, Aquino-Cortez A, Silva AR, Cardoso RCS, Silva LDM (2002) *Relação entre perímetro escrotal e concentração espermática em cães*,

clínicamente normais, da raça Pastor Alemão. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia, 54(5): 549-550.

14. Coulter GH, Foote RH (1979) *Bovine testicular measurements as indicators of reproductive performance and their relationship to productive traits in cattle.* Theriogenology, 11(4): 297-311.
15. Cunningham JG, Bradley GK (2009), *Fisiología reproductiva del macho.* En: Cunningham JG, Bradley GK, *Fisiología Veterinaria.* 4ª ed. Barcelona, Elsevier, pp. 517-525.
16. Dahlbom M, Anderson M, Juga J, Alanko M (1997) *Fertility parameters in male Irish wolfhounds: a two-year follow-up study.* Journal of Small Animal Practice, 38(12): 547-550.
17. Dahlbom M, Andersson M, Huszenicza G, Alanko M (1995) *Poor semen quality in Irish wolfhounds: A clinical, hormonal and spermatological study.* Journal of Small Animal Practice, 36(12): 547-552.
18. Dellman HD, Carithers JR (1999) *Aparato reproductor masculino.* En: Dellman HD, Carithers JR. *Citología e Histología.* Buenos Aires, Intermédica, pp.337-357.
19. Dellman HD, Wrobel KH (1993) *Sistema reproductor masculino.* En: Dellman HD, *Histología Veterinaria.* 2ª ed. Zaragoza, Acribia, pp. 245-266.
20. Dyce KM (1999) *Anatomía Veterinaria.* 2ª ed. México, Interamericana McGraw Hill, 952 p.
21. Elmore RG, Bierschwal CJ, Youngquist RS (1976) *Scrotal circumference measurements in 764 beef bulls.* Theriogenology, 6(5): 485-494.
22. England (1991) *Relationship between ultrasonographic appearance, testicular size, spermatozoal output and testicular lesions in the dog.* Journal of Small Animal Practice, 32: 306-311.
23. Fawcett DW (1995) *Sistema reproductor.* En: Fawcett DW. *Tratado de Histología.* 12ª ed. Madrid, Interamericana McGraw Hill, pp. 833-884.
24. Fernández D (1987) *Epermatogénesis.* En: Fernández D. *Principios de fisiología reproductiva ovina.* Montevideo, Hemisferio Sur, pp. 135-164.
25. Fernández D (1995) *La importancia del carnero en la fertilidad del rebaño.* En: Fernández D. *Temas de reproducción ovina e inseminación artificial en bovinos y ovinos.* Montevideo, Hemisferio Sur, pp. 15-36.
26. Fields MJ, Burns WC y Warnick AC (1979) *Age, Season and Breed Effects on Testicular Volume and Semen Traits in Young Beef Bulls.* Journal of Animal Science, 48(6): 1299-1304.

27. Gipson TA, Vogt DW, Massey JW, Eilersieck MR (1985) *Associations of scrotal circumference with semen traits in young beef bulls*. Theriogenology, 24(2): 217-225.
28. Gordon I (2006) *Control de la reproducción estacional*. En: Gordon I. *Tecnología de la reproducción de los animales de granja*. Zaragoza, Acribia, pp. 241-262.
29. Günzel-Apel A (2010) *Inseminación artificial de la perra*. En: Busch W, Waberski D. *Manual de Inseminación Artificial de los animales domésticos y de exploración zootécnica*. Zaragoza, Acribia, pp. 299-320.
30. Hahn J, Foote RH, Seidel GE (1969) *Testicular Growth and Related Sperm output in Dairy Bulls*. Journal of Animal Science, 29: 41-47.
31. Hill R, Wyse G, Anderson M (2006) *Reproducción*. En: Hill R, Wyse G, Anderson M, *Fisiología Animal*. Madrid, Panamericana, pp. 497-525.
32. Linde-Forsberg C (1991) *Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen*. Vet. Clin. North. Am. Small Animal Practice, 21: 467-485.
33. Linford E, Glover FA, Bishop C, Stewart DL (1976) *Testicular and semen pathologies*. Journal of Reproduction and Fertility, 47(2): 283-291.
34. Mc Donald LE (1991) *Sistema reproductor de la hembra*. En: Mc Donald LE. *Endocrinología veterinaria y reproducción*. 4ª ed. México, Interamericana, pp. 294-344.
35. Noden DM, De Lahunta A (1990) *Desarrollo del Aparato Urogenital*. En: Noden DM, De Lahunta A. *Embriología Básica de Patten*. México, Interamericana McGraw Hill, pp. 564-603.
36. Oettle EE, Soley JT (1988) *Anomalías de los espermatozoides en el perro: estudio de imágenes obtenidas al microscopio óptico y electrónico*. Noticias Médico Veterinarias, 59: 28-70.
37. Olar TT, Amann RP, Picket BW (1983) *Relationships Among Testicular Size, Daily Production and Output of Spermatozoa, and Extragonadal Spermatozoal Reserves of the Dog*. Biology of Reproduction, 29: 1114-1120.
38. Ortega-Pacheco A, Segura-Correa JC, Bolio-Gonzalez M (2006) *Reproductive patterns of stray male dogs in the tropics*. Theriogenology, 66(9): 2084-2090.
39. Peña AI (2007) *Evaluación del semen canino*. En: Gobello C. *Temas de reproducción de caninos y felinos por autores hispanoamericanos*. 2ªed. Santa Fe, Megaprint, pp. 146-163.

40. Peña JF (2006) *Fisiología reproductiva del macho*. En: Wanke MM, Gobello C. *Reproducción en caninos y felinos domésticos*, Buenos Aires, Inter-Médica, pp. 129-137.
41. Peterson E, Aurich C (2005) *La reproducción en el macho*. En: Engelhardt W, Breves G. *Fisiología Veterinaria*. Zaragoza, Acribia, pp. 567-585.
42. Rota A, Linde-Forsberg C, Vannozzi J, Rowagnoli S, Rodriguez-Martinez H (1998) *Criosurvival of dog spermatozoa at different glycerol concentrations and freezing/thawing rates*. *Reproduction in Domestic Animals*, 33: 355-361.
43. Silva AR, Cardoso RCS, Uchoa DC, Silva LDM (2003) *Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process*. *Theriogenology*, 59: 821-829.
44. Sorribas CE (1999) *Reproducción en los animales pequeños*, 2ª ed. Buenos Aires, Inter-Médica, 200 p.
45. Stornelli MA (2003) *Evaluación de semen en caninos. Interpretación de los resultados obtenidos*. En: Ungerfeld R, *Reproducción en los animales domésticos*. Montevideo, Melibea, V.2, pp. 419-427.
46. Subev M, Ivanova-Kicheva MG, Sowlev B (1996) *Testes size and sperm production in dogs*. *Macedonian Journal of Reproduction*, 2(1): 99-103.
47. Taha MB, Noakes DE, Allen WE (1981) *The effect of season of the year on the characteristics and composition of dog semen*. *Journal of Small Animal Practice*, 22: 177-184.
48. Tello L, De los Reyes S, Bernal A (1998) *Descripción de algunas características seminales en caninos de raza Ovejero Alemán*. *Avances en Ciencia Veterinaria*, 3(1): 52-56.
49. Thompson JA, Johnson WH (1995) *Scrotal size of yearling sires and early calving in beef herds: epidemiological investigation of possible causal pathways*. *Theriogenology*, 43(7): 1279-1287.
50. Ungerfeld R (2002) *Reproducción en los animales domésticos*. Montevideo, Melibea, V.1, 289p.
51. Veeramachaneni DNR, Ott RS, Heath EH, Mc Entee K, Bolt DJ, Hixon JE (1986) *Pathophysiology of small testes in beef bulls; relationship between scrotal circumference, histopathology features of testes and epididymis, seminal characteristics and endocrine profiles*. *American Journal of Veterinary Research* 47(9): 1988-1999.