



UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL

**Estudio Ecográfico Doppler Pulsado y Color de
los Testículos en el Perro y su Utilidad como
Predictor de la Calidad Seminal**

**Dña. Juana Dolores Carrillo Sánchez
2015**

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

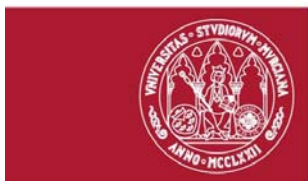


UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE VETERINARIA

**“ESTUDIO ECOGRÁFICO DOPPLER
PULSADO Y COLOR DE LOS TESTÍCULOS
EN EL PERRO Y SU UTILIDAD COMO
PREDICTOR DE LA CALIDAD SEMINAL”**

**D^a Juana D. Carrillo Sánchez
2015**



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D^a AMALIA AGUT GIMÉNEZ, Catedrática de la Universidad del Área de Medicina y Cirugía Animal en el Departamento de Medicina y Cirugía Animal en la Facultad de Veterinaria, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "**ESTUDIO ECOGRÁFICO DOPPLER PULSADO Y COLOR DE LOS TESTÍCULOS EN EL PERRO Y SU UTILIDAD COMO PREDICTOR DE LA CALIDAD SEMINAL**", realizada por **D^a Juana Dolores Carrillo Sánchez**, bajo mi dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

Murcia, 22 de Diciembre del 2014

Dra. Amalia Agut Giménez



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D^a XIOMARA LUCAS ARJONA, Profesora Titular de la Universidad del Área de Medicina y Cirugía Animal en el Departamento de Medicina y Cirugía Animal en la Facultad de Veterinaria, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "**ESTUDIO ECOGRÁFICO DOPPLER PULSADO Y COLOR DE LOS TESTÍCULOS EN EL PERRO Y SU UTILIDAD COMO PREDICTOR DE LA CALIDAD SEMINAL**", realizada por **D^a Juana Dolores Carrillo Sánchez**, bajo mi dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

Murcia, 22 de Diciembre del 2014

Dra. Xiomara Lucas Arjona



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D^a MARTA SOLER LAGUIA, Profesora Contratada Doctor de la Universidad del Área de Medicina y Cirugía Animal en el Departamento de Medicina y Cirugía Animal en la Facultad de Veterinaria, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "**ESTUDIO ECOGRÁFICO DOPPLER PULSADO Y COLOR DE LOS TESTÍCULOS EN EL PERRO Y SU UTILIDAD COMO PREDICTOR DE LA CALIDAD SEMINAL**", realizada por **D^a Juana Dolores Carrillo Sánchez**, bajo mi dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

Murcia, 22 de Diciembre de 2014

Dra. Marta Soler Laguia

**A mi ahijado,
ALFONSO CARRILLO MARTÍNEZ**

AGRADECIMIENTOS

MI MÁS SINCERO AGRADECIMIENTO:

A mis directoras de tesis, las doctoras AMALIA AGUT GIMÉNEZ, XIOMARA LUCAS ARJONA Y MARTA SOLER LAGUIA, por su valiosa dirección, apoyo y paciencia durante todo el proceso de realización de este trabajo. Así como por ser mis compañeras, amigas y un referente tanto en lo personal como en lo profesional.

A la unidad docente de la asignatura de Reproducción y Obstetricia del Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Universidad de Murcia, y muy en especial a JORDI ROCA, INMA PARRILLA, TOÑI GIL y CRISTINA CUELLO sin cuya ayuda, consejos y conocimientos, habrían hecho de este proyecto algo inalcanzable para mí.

A ANA GUTIERREZ y CRISTINA PEÑAFIEL, por ocupar su tiempo, durante la parte experimental del trabajo, en ayudarme y acompañarme en todas y cada una de las ecografías testiculares. Sin vuestro apoyo no habría sido tan amena su realización.

A JOAQUIN PAREDES por darme un soporte técnico y ayuda, siempre que lo he necesitado.

A mis compañeros MIGUEL ANGEL SANCHEZ-VALVERDE, PEPE MURCIANO y TONI NAVARRO por su inestimable apoyo y confianza en mí, en todo momento.

A MARIA TERESA ESCOBAR, MARIA JESUS RODRÍGUEZ y CARLA AGUIRRE por ser compañeras, amigas y estar siempre a mi disposición cuando os he necesitado. Vuestro apoyo y ayuda han sido un desahogo para mí en los momentos de flaqueza. En especial a MAYTE, por aguantarme años y años en nuestro despachito, con todo lo que supone, y que sea por mucho tiempo más, GRACIAS.

A ASTA TVARIJONAVICIUTE por ser una gran amiga, confidente y un apoyo profesional inestimable. Gracias por ser para mí una guía y un ejemplo de buen hacer.

A todos mis amigos y mis compañeros de trabajo del HOSPITAL CLÍNICO VETERINARIO de la Universidad de Murcia. En especial, a ANABEL CASTRO, EVA GIMÉNEZ, PATRICIA LEAL, FRANCISCO DE MEMBIELA y CARLOS MICO, por hacer del día a día algo más fácil, y por vuestra ayuda cuando lo he necesitado.

A mis amigas del alma DOLO, EVA, LUISA, YOLI y MARIFE, por ser mi vía de escape y estar siempre conmigo.

Y eternamente a mi familia, a mis padres, a mi hermano y a la personita más importante, mi ahijado ALFONSO, por ser ELLOS mi luz, mi equilibrio, mi apoyo y mi todo.

A todos y cada uno de ellos, MUCHÍSIMAS GRACIAS.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	7
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	11
3.1. Anatomía del testículo en el perro	13
3.2. Vascularización del testículo en el perro	16
3.3. Espermatogénesis	18
3.3.1. <u>Factores que afectan a la espermatogénesis</u>	19
3.3.1.1. <i>Factores hormonales</i>	19
3.3.1.2. <i>Factores no hormonales</i>	20
3.4. Proceso de eyaculación	22
3.5. Métodos de valoración seminal	24
3.5.1. <u>Estudio macroscópico</u>	24
3.5.1.1. <i>Color</i>	24
3.5.1.2. <i>Volumen</i>	25
3.5.2. <u>Estudio microscópico</u>	26
3.5.2.1. <i>Motilidad espermática</i>	26
3.5.2.2. <i>Concentración espermática</i>	29
3.5.2.3. <i>Morfología y viabilidad espermática</i>	31
3.5.2.4. <i>Estado del acrosoma</i>	36
3.5.3. <u>Estudio bioquímico</u>	37
3.6. Ecografía Doppler	38
3.6.1. <u>Características del flujo sanguíneo</u>	38
3.6.2. <u>Principios de la ecografía Doppler</u>	39
3.6.3. <u>Tipos de ecografía Doppler</u>	43
3.6.3.1. <i>Doppler continuo</i>	43

3.6.3.2. <i>Doppler pulsado</i>	44
3.6.3.3. <i>Doppler color</i>	45
3.6.3.4. <i>Doppler potenciado (Power Doppler)</i>	47
3.6.3.5. <i>Sistema Dúplex</i>	47
3.6.4. <u>Aplicaciones clínicas de la ecografía Doppler</u>	48
3.6.4.1. <i>Estudio cualitativo</i>	48
3.6.4.2. <i>Estudio cuantitativo</i>	51
3.6.4.3. <i>Estudio semicuantitativo</i>	51
3.6.5. <u>Errores y artefactos Doppler</u>	52
3.6.5.1. <i>Toma incorrecta del ángulo de flujo</i>	52
3.6.5.2. <i>Aliasing</i>	53
3.6.5.3. <i>Uso de una FRP alta</i>	54
3.6.5.4. <i>Imagen especular</i>	54
3.6.5.5. <i>Interpretación errónea</i>	55
3.6.6. <u>Ecografía Doppler de los testículos</u>	56
3.6.6.1. <i>Aplicación de la ecografía Doppler como predictor de la espermatogénesis</i>	59
4. MATERIAL Y MÉTODOS	61
4.1. Material	63
4.1.1. <u>Material animal</u>	63
4.2. Métodos	64
4.2.1. <u>Examen ecográfico Doppler</u>	64
4.2.2. <u>Evaluación seminal</u>	67
4.2.2.1. <i>Recogida seminal</i>	67
4.2.2.2. <i>Contrastación del eyaculado</i>	68
4.2.3. <u>Diseño experimental</u>	74

4.2.3.1. <i>Experiencia 1: Describir la morfología de la onda espectral y establecer los valores de VPS, VFD, IR e IP de las arterias testiculares en el perro</i>	74
4.2.3.2. <i>Experiencia 2: Establecer la correlación entre los valores del IR de las arterias testiculares con los parámetros de concentración y motilidad espermática en el perro</i>	74
4.2.4. <u>Análisis estadístico</u>	76
5. RESULTADOS	77
5.1. Experiencia 1: Describir la morfología de la onda espectral y establecer los valores de VPS, VFD, IR e IP de las arterias testiculares en el perro	79
5.2. Experiencia 2: Establecer la correlación entre los valores del IR de las arterias testiculares con los parámetros de concentración y motilidad espermática en el perro	82
6. DISCUSIÓN	91
6.1. Experiencia 1: Describir la morfología de la onda espectral y establecer los valores de VPS, VFD, IR e IP de las arterias testiculares en el perro	95
6.2. Experiencia 2: Establecer la correlación entre los valores del IR de las arterias testiculares con los parámetros de concentración y motilidad espermática en el perro	99
7. CONCLUSIONES	109
8. RESUMEN	113
9. SUMMARY	119
10. BIBLIOGRAFÍA	125

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

La ecografía es un método ampliamente utilizado en el diagnóstico de patologías y desórdenes reproductivos en el sexo masculino, tanto en medicina humana (Lavoipierre, 2000) como en veterinaria (Johnston y cols., 1991a). La ecografía Doppler color y pulsada son un complemento a la información obtenida con el modo B (Lavoipierre, 2000).

En el hombre se han determinado, mediante ecografía Doppler, las características de las ondas espectrales de las arterias testiculares y los valores de sus parámetros cuantitativos como son la velocidad del pico sistólico (VPS) y velocidad al final de la diástole (VFD), y semicuantitativos como el índice de resistividad (IR) y pulsatilidad (IP) (Middlenton y cols., 1989).

La ecografía Doppler, también permite valorar la integridad y perfusión testicular, siendo de utilidad en hombres con azoospermia, en los que se ha demostrado que la cantidad y calidad espermática depende de la perfusión tisular de sus testículos (Herwig y cols., 2007). Por otra parte, el estudio del valor del IR en las arterias testiculares se emplea para diferenciar la azoospermia obstructiva de la no obstructiva

(Foresta y cols., 1998; Battaglia y cols., 2001; Souza y cols., 2005) y en el diagnóstico de enfermedades escrotales (Ünsal y cols., 2007; Pinggera y cols., 2008; Schurich y cols., 2009).

Todo ello ha llevado a la realización de diferentes estudios en el hombre, encaminados a correlacionar las características de las ondas espectrales en las arterias testiculares con la espermatogénesis, observándose que el valor del IR en las arterias intratesticulares es un parámetro que permite identificar pacientes infértiles o dispérmicos (Biagiotti y cols., 2002), sugiriendo que puede ser utilizado como predictor de la espermatogénesis (Pinggera y cols., 2008; Al-Naffakh, 2012)

En medicina veterinaria y en concreto en la especie canina, la ecografía en modo B se emplea para observar los cambios de ecogenicidad y ecotextura que se producen tanto en los testículos como en la próstata (Bright y England, 2011), permitiendo en el testículo diagnosticar la criptorquidia inguinal o abdominal (Johnston y cols., 1991a), neoplasias (Johnston y cols., 1991b; England, 1995) y la torsión testicular (Hecht y cols., 2004).

El Doppler color y pulsado permiten obtener una información anatómica y funcional de los vasos sanguíneos y su flujo, indicando la presencia o ausencia del mismo, su dirección y velocidad. Por ello, son las técnicas de elección para valorar la perfusión tisular y los cambios en la vascularización de testículos y próstata (Günzel-Apel y cols.,

2001; Nyland y cols., 2002; Pozor y McDonnell, 2004; Zelli y cols., 2013a; Souza y cols., 2014).

Sin embargo, a pesar de que el Doppler color y pulsado son utilizados en el estudio andrológico del perro, existe poca información sobre las características del flujo y los parámetros cuantitativos y semicuantitativos de las arterias testiculares, ya que los estudios publicados hasta ahora no incluyen a las arterias intratesticulares (Günzel-Apel y cols., 2001; Souza y cols., 2014) o presentan la limitación de realizarse en un único ensayo (Günzel-Apel y cols., 2001; Gumbsch y cols., 2002). Por otra parte, recientemente se ha sugerido que los parámetros IR e IP pueden ser empleados como marcadores potenciales de la calidad seminal en el perro (Bright y England, 2011; Zelli y cols., 2013b), al igual que ocurre en el hombre.

Ante lo anteriormente expuesto, en la presente Tesis Doctoral se plantea el estudio mediante el Doppler color y pulsado de las características del flujo y parámetros cuantitativos y semicuantitativos de las arterias testiculares (arteria supratesticular, marginal e intratesticulares), así como su posible correlación con las características seminales en el perro.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Los objetivos del presente estudio son:

1. Describir la morfología de la onda espectral y establecer valores de referencia de la VPS, VFD, IR e IP de las arterias testiculares en el perro.
2. Establecer la correlación entre los valores del IR de las arterias testiculares con los parámetros seminales de concentración y motilidad espermática en el perro.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1. Anatomía del testículo en el perro

Los testículos de los carnívoros son relativamente pequeños y tienen forma ovoidal (Ellenport, 1985), su superficie es lisa y convexa (Schwarze y Schröder, 1970). Presentan una posición oblicua dentro de la cavidad escrotal, localizándose el testículo cráneo-ventralmente y el epidídimo cráneo-dorsalmente. El parénquima de los testículos es una masa blanda que al cortar la cápsula sale al exterior debido a la presión existente en su interior (Schwarze y Schröder, 1970).

La mayor parte de la superficie del testículo y el cordón espermático están cubiertos por una membrana serosa llamada túnica vaginal (Illera, 1994). Por debajo de ella se encuentra una cápsula fibrosa llamada túnica albugínea, por la cual discurren las ramas de la arteria testicular interna, que se dirigen hacia la cabeza y cola del epidídimo (Schwarze y Schröder, 1970).

Desde la túnica albugínea parten prolongaciones de tejido conjuntivo hacia el interior de los testículos, constituyendo el tejido intersticial, y estas prolongaciones se unen entre sí en la zona central

de los testículos formando el mediastino testicular ("*mediastinum testis*"). Mediante estas prolongaciones de tejido conjuntivo el parénquima testicular queda dividido en numerosos lóbulos, cuyas bases están dirigidas periféricamente hacia el "*mediastinum testis*" (Schwarze y Schröder, 1970).

Estos lóbulos están compuestos por conductos seminíferos. El epitelio de los conductos seminíferos es un epitelio estratificado conformado por unos elementos de soporte: las células de Sertoli y las células espermatogénicas. Éstas últimas incluyen varios tipos celulares morfológicamente diferenciales, que se corresponden a las fases sucesivas del proceso continuo de diferenciación de las células germinales masculinas (espermatogonias, espermatocitos, espermátidas y espermatozoides) denominado ciclo espermatogénico (Schwarze y Schröder, 1970).

El intersticio testicular está constituido por fibroblastos, macrófagos y células cebadas junto a células intersticiales epitelioides o células de Leydig que constituyen el tejido endocrino del testículo (Schwarze y Schröder, 1970).

Cada lóbulo testicular está constituido por dos o tres grupos de conductos seminíferos, que se originan en la periferia del testículo como un saco ciego y se dirigen formando los túbulos seminíferos contorneados hacia el mediastinum testis, donde se convierten en los túbulos seminíferos rectos y desembocan en la red testicular (o también denominada "*rete testis*"). De la "*rete testis*" parten los conductos

eferentes (entre 15-16) que abandonan los testículos por su porción cráneo-ventral y se dirigen hacia el epidídimo (Schwarze y Schröder, 1970).

El epidídimo está compuesto por cabeza, cuerpo y cola (Fig.1). Se localiza en el borde cráneo-dorsal de los testículos, contactando con ellos (Schwarze y Schröder, 1970). Constituye el receptáculo y estructura conductora de los espermatozoides inmaduros elaborados en el testículo. El conducto del epidídimo es largo, pudiendo alcanzar hasta los cinco u ocho metros, y se encuentra extremadamente enrollado sobre sí mismo (Schwarze y Schröder, 1970; Ellenport, 1985). Este conducto está tapizado por un epitelio pseudoestratificado cilíndrico ciliado, constituido a su vez por células principales y basales (Schwarze y Schröder, 1970).

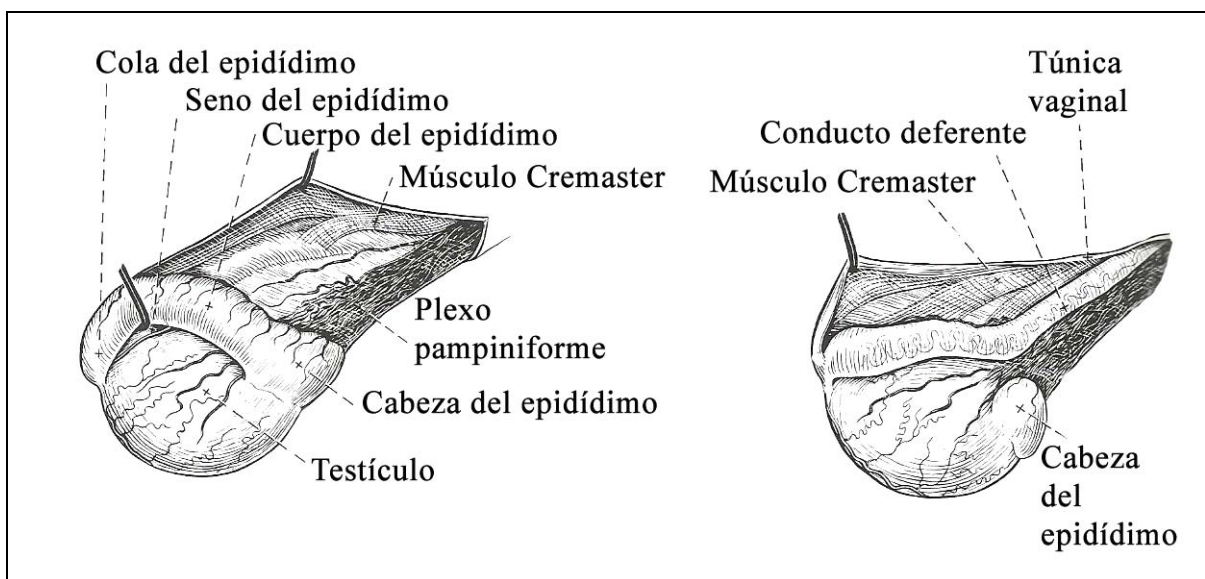


Figura 1. Imagen anatómica de los testículos del perro (Evans y Christensen, 1993).

El conducto deferente es la continuación de la cola del epidídimo, y llega incluido dentro del cordón espermático, hasta la superficie cráneo-dorsal de la próstata (Schwarze y Schröder, 1970).

3.2. Vascularización del testículo en el perro

La arteria testicular en el perro es rama directa de la aorta, como sucede en el hombre, y se dirige caudalmente hacia el testículo y epidídimo pasando a través del anillo inguinal. El testículo también recibe vascularización de otras dos arterias, la arteria cremastérica y la deferencial, que son ramas de la arteria ilíaca interna (Senger, 2003).

Las arterias testicular, cremastérica y deferencial conforman un paquete arterial, que queda envuelto por una red vascular formada por ramificaciones de las venas testiculares (Senger, 2003) que se denomina plexo pampiniforme, el cual constituye el drenaje venoso del testículo y epidídimo (Zwiebel y cols., 2005) y drena a la vena cava caudal (Senger, 2003). El plexo pampiniforme es una estructura altamente especializada, con la importante función de controlar la temperatura del testículo (Senger, 2003).

En la mayoría de los animales, la temperatura del testículo para que pueda producirse la espermatogénesis es de 4 a 6° C por debajo de la temperatura corporal (Senger, 2003). El complejo de arterias y venas forma una pseudocorriente intercambiadora de calor, de forma que al

abandonar la superficie testicular, el calor de la sangre arterial del cuerpo (39° C) es transferido a los vasos venosos (33° C), que se enfrían por la pérdida de calor directa a través de la piel del escroto (Senger, 2003).

La arteria testicular cuando llega al testículo da lugar a la arteria supratesticular, que se introduce por debajo de la túnica albugínea como la arteria capsular o también denominada marginal, la cual rodea periféricamente al testículo y se ramifica en las arterias intratesticulares que se dirigen a través del parénquima del testículo hacia el mediastinum testis (Fig. 2) (Gumbsch y cols, 2002). El drenaje venoso discurre paralelo a la distribución arterial (Zwiebel y cols., 2005).

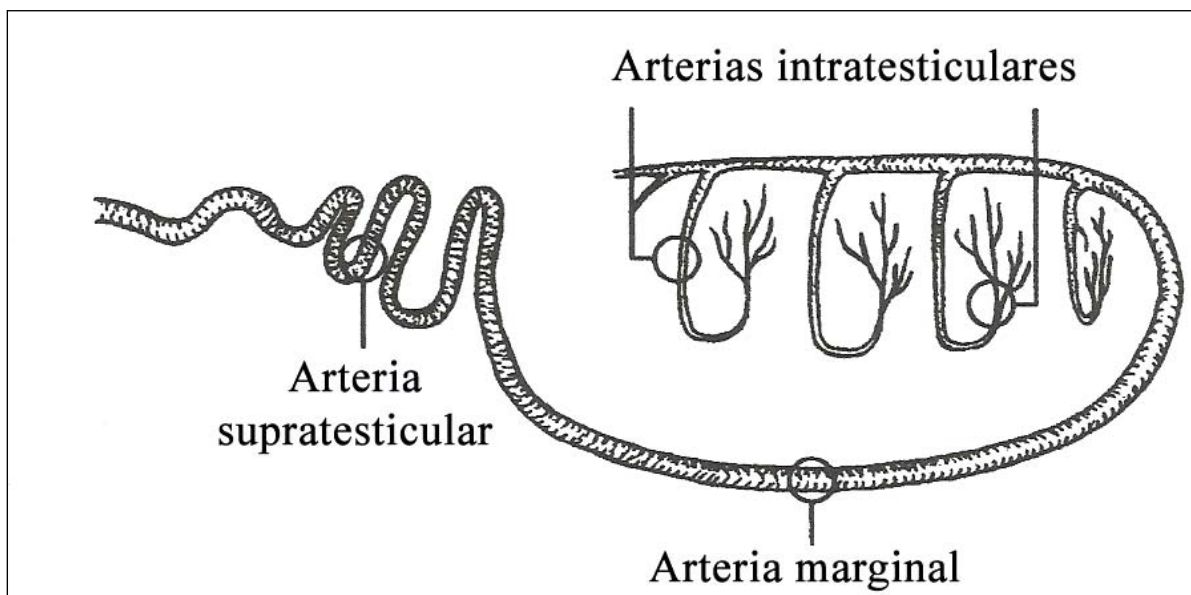


Figura 2. Esquema de la vascularización del testículo del perro (Gumbsch y cols., 2002).

3.3. Espermatogénesis

Consiste en la formación de espermatozoides, se produce en el epitelio germinal de los túbulos seminíferos, y se divide en dos pasos (Johnston y cols., 2001):

- a) espermatocitogénesis, consistente en la formación de espermátidas a partir de espermatogonias,
- b) espermiogénesis, que es la diferenciación de espermátidas en espermatozoides.

Los espermatozoides inmaduros son liberados desde los túbulos seminíferos contorneados al interior de los túbulos rectos, así llegan a la "*rete testis*" y a través de los conductos eferentes entran en el epidídimo, donde los espermatozoides adquieren la capacidad de moverse y por tanto su capacidad de fertilizar, quedando almacenados en la cola del epidídimo (Johnston y cols., 2001).

La espermatogénesis se produce constantemente e independientemente de la frecuencia de eyaculado, por lo que dentro de los túbulos seminíferos pueden presentarse cuatro o cinco generaciones celulares en desarrollo (Johnston y cols., 2001).

En la espermatogénesis las diferentes divisiones celulares se producen durante un intervalo de tiempo fijo, que en el perro está descrito cada 13.6 ± 0.7 días. Siendo la duración total de un ciclo

espermático completo en el perro de aproximadamente 4.5 veces la longitud de un ciclo espermatogénico, es decir, aproximadamente 62 días (Illera, 1994; Johnston y cols., 2001).

Por otro lado, estudios más recientes describen que para la raza Beagle la duración total de la espermatogénesis es de 61.9 ± 0.14 días (Soares y cols., 2009).

3.3.1. Factores que afectan a la espermatogénesis

3.3.1.1. *Factores hormonales*

La testosterona y las gonadotropinas hipofisarias LH y FSH, son hormonas claves para regular la espermatogénesis, actuando sinérgicamente para producir el desarrollo de las células germinales (Illera, 1994).

La FSH y la LH son producidas por la glándula pituitaria en respuesta a la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) secretada por el hipotálamo (Zirkin, 1999).

La LH estimula a las células de Leydig para que secreten la testosterona. La cual es necesaria para mantener el número de células germinales en el testículo del animal adulto, interviniendo en la adhesión de las espermátidas a las células de Sertoli, de forma que si hay una disminución de la concentración de testosterona en el testículo

perdiéndose la adhesión de las espermátidas, por lo que no se produce su maduración a espermatozoides (Zirkin, 1999).

Con respecto a la FSH, se ha demostrado que su liberación produce un incremento en el número de espermatogonias y espermatocitos pero no en el desarrollo de las espermátidas (Zirkin, 1999).

Los receptores tanto para la testosterona como para la FSH se encuentran en las células de Sertoli (Zirkin, 1999).

3.3.1.2. Factores no hormonales

Los factores no hormonales que intervienen en el control de la espermatogénesis son principalmente la temperatura (Illera, 1994; Henning y cols., 2014) y la influencia estacional (Albrizio y cols., 2013).

Existen otros factores que también pueden influir en la producción espermática como son la radiación, la ingestión de determinados fármacos o sustancias tóxicas, el déficit de vitaminas, el tipo de dieta (Illera, 1994), las enfermedades sistémicas o incluso la edad del animal (Rijsselaere y cols., 2007).

En la mayoría de los mamíferos, incluido el hombre, el proceso de espermatogénesis depende de la temperatura de los testículos, la cual es de varios grados por debajo de la temperatura corporal. Esta diferencia de temperatura es esencial para la producción normal del espermatozoide y la fertilidad del macho adulto (Kerr, 1999).

Episodios intermitentes de temperatura elevada pueden provocar alteraciones en la morfología y en la calidad del espermatozoide, pudiéndose llegar a la infertilidad o incrementar el riesgo de presentación de cambios patológicos como los tumores testiculares (Kerr, 1999).

En el hombre, la temperatura escrotal está alrededor de 33° C y se ha descrito que una exposición durante cinco días a 38–40° C en los testículos provoca una reducción en la actividad espermática, y tras diez días, una actividad nula (Kerr, 1999). Sin embargo en el perro, cuya temperatura escrotal normal es de 35° C, exposiciones de 36–42° C durante dos días no inducen a cambios ni en la calidad ni en la cantidad de semen, a diferencia de lo que ocurre en otras especies como el toro, carnero, ratón y caballo (Henning y cols., 2014).

En cuanto a la influencia estacional no se ha demostrado que tenga acción sobre la función espermatogénica en el perro. Aunque recientemente, Albrizio y cols. (2013) describen que los perros domésticos, a pesar de ser considerados reproductores no estacionales, muestran algunas analogías en sus patrones reproductivos con los observados en sus ancestros como el lobo, el coyote o el perro salvaje africano. Así, estos autores (Albrizio y cols., 2013) no encontraron variaciones estadísticamente significativas en la concentración de testosterona sérica a lo largo de un año, aunque sí que observaron variaciones significativas en la concentración de testosterona en el líquido seminal, obteniendo una correlación negativa entre la concentración de testosterona seminal y la motilidad espermática total

del eyaculado. Marzo y abril fueron los meses donde se describieron los valores de concentración de la testosterona seminal más bajos, momento en el cual los valores de motilidad total estaban en su punto más alto. Esta correlación probablemente destaca el hecho de que los valores óptimos de motilidad total aumentan la posibilidad de que el espermatozoide alcance el óvulo en el momento del año con las mejores condiciones ambientales para que aumente la tasa de supervivencia de los cachorros. Esto, según los autores (Albrizio y cols., 2013), puede ser un rasgo del patrón reproductivo que el perro todavía conserva de sus antepasados.

3.4. Proceso de eyaculación

El fenómeno de la eyaculación se produce como resultado de una monta natural o tras una correcta estimulación peneana (Kutzler, 2005).

Existen diferentes métodos de recogida del eyaculado. La recogida manual o digital, que es el método más utilizado en la especie canina y consiste en la estimulación manual del bulbo peneano y recogida en un recipiente de plástico o cristal atemperado (37°C) acoplado a un embudo de cristal o de plástico (Kutzler, 2005).

Otros métodos son: la recogida con cono de látex, que es una banda de caucho en forma de embudo que es sostenido con una mano al mismo tiempo que se realiza la estimulación del bulbo; y la electro-

eyaculación, la cual consta de un electrodo bipolar que se coloca sobre las glándulas accesorias y de una fuente de corriente alterna que provoca la estimulación y eyaculación del macho (Kutzler, 2005).

El proceso del eyaculado está constituido por tres fases (Nagai y cols., 2005):

- Primera fase, de emisión, en la que el fluido seminal es enviado hacia la uretra prostática.
- Segunda fase, en la que se crea presión en la zona posterior de la uretra con cierre del cuello de la vejiga.
- Tercera fase, de expulsión del semen, en la que el fluido seminal es enviado desde las vesículas seminales a los bulbos de la uretra a través del conducto eyaculatorio.

Todo este proceso está mediado por el sistema nervioso simpático, vía el nervio hipogástrico. La inervación simpática provoca el cierre del cuello de la vejiga, permitiendo la formación de la presión dentro de la uretra prostática y evitando el flujo del semen hacia la vejiga de la orina (Johnston y cols., 2001).

Para la propulsión del semen a través de la uretra peneana se requiere la contracción de los músculos bulboesponjosos e isquiocavernosos, la cual es inervada por la rama somática del nervio pudiendo (Johnston y cols., 2001).

3.5. Métodos de valoración seminal

La valoración seminal en la especie canina consiste en un estudio de los parámetros que determinan las características del semen. Para su realización existen numerosos métodos (Johnston y cols., 2001).

3.5.1. Estudio macroscópico

El estudio del semen comienza con la evaluación de los parámetros observables de forma directa (Peña, 1997).

3.5.1.1. Color

En la especie canina el color normal del semen es de un blanco opalescente o lechoso, si bien su intensidad puede modificarse en función de la concentración del eyaculado (Peña, 1997).

El método de valoración del color es mediante la observación directa del semen en el tubo graduado utilizado para la recogida (Peña, 1997; Johnston y cols., 2001).

Las modificaciones más habituales son debidas a la presencia de (Peña, 1997; Johnston y cols., 2001):

- sangre de origen prostático, testicular o peneano, dando una tonalidad roja o marronácea,
- exudado purulento, procedente de una infección genital, presentando un color verdoso,
- contaminación por la orina o un exudado inflamatorio, observándose con un color amarillento.

3.5.1.2. Volumen

El volumen del eyaculado aunque es un parámetro importante a la hora de evaluar el semen (Johnston y cols., 2001), no es un referente para determinar la calidad seminal, ya que es un parámetro de gran variabilidad en función de la edad, tamaño del animal, frecuencia de recogida y cantidad de fracción prostática (Feldman y Nelson, 2007).

No obstante, de forma general, se puede establecer que los valores medios del eyaculado en el perro se encuentran, dependiendo de la raza y el individuo, entre los siguientes rangos (Johnston y cols., 2001):

- fracción pre-espermática: 0.1 – 5 ml
- fracción espermática: 0.2 – 4 ml
- fracción prostática: 1 – 80 ml

3.5.2. Estudio microscópico

Son diversos los parámetros seminales estudiados a nivel microscópico para determinar la calidad del semen en la especie canina (Peña, 2004).

Los métodos de microscopía convencional utilizados para la evaluación espermática, combinados con los sistemas más objetivos como la citometría de flujo y las técnicas de asistencia computerizada, aplicados a parámetros relacionados con el análisis de la motilidad y la morfología de los espermatozoides, han supuesto una evolución en la investigación de la calidad seminal, permitiendo obtener una información más precisa sobre el estatus morfo-funcional de los espermatozoides (Peña, 2004).

3.5.2.1. *Motilidad espermática*

Es uno de los parámetros de mayor importancia durante la estimación de la calidad seminal.

Consiste en determinar el porcentaje de espermatozoides que presentan movimiento en una muestra, bien sea de forma general o cuantificando los espermatozoides capaces de manifestar un movimiento progresivo. La naturaleza del movimiento de los espermatozoides da información sobre su capacidad de fertilización (Peña, 1997; Peña, 2004).

El porcentaje de espermatozoides móviles está correlacionado con la integridad de la membrana plasmática y la morfología normal espermática (Peña, 1997; Peña, 2004).

La valoración de la motilidad espermática suele ser el primer criterio a examinar tras la recogida seminal (Feldman y Nelson, 2007), ya que es uno de los parámetros que antes se afectan por las variaciones en la temperatura, para evitar estas alteraciones en el eyaculado se debe trabajar siempre con material atemperado a 37-38° C (Peña, 1997).

En función del autor consultado el rango de motilidad espermática normal varía. Así, England y Allen (1992) consideran que el perro es fértil con una motilidad del 90-95%, y señalan que hay un descenso de la fertilidad cuando la motilidad es inferior al 80%.

Otros autores (Johnston y cols., 2001; Feldman y Nelson, 2007) establecen que el porcentaje de espermatozoides móviles en el eyaculado del perro debe superar el 70%. En trabajos realizados con sistemas computerizados, la motilidad espermática canina queda registrada en valores del 88% espermatozoides móviles y un 81% de ellos con motilidad progresiva (Rijsselaere y cols., 2004).

En la actualidad, la motilidad espermática puede estudiarse a través del uso de diferentes procedimientos, descritos a continuación:

- Motilidad subjetiva:

Consiste en una observación visual directa del semen. Para su realización se deposita una pequeña gota de semen entre un portaobjetos y un cubreobjetos, obteniéndose una fina capa de semen que permite observar el movimiento de los espermatozoides. Esta preparación se coloca en un microscopio, con platina calefactora, evaluando la muestra con aumentos de 10x, 20x o 40x (Peña, 1997; Feldman y Nelson, 2007).

Este método permite determinar, de forma subjetiva, el movimiento anterógrado de los espermatozoides, presencia de aglutinaciones, porcentaje de espermatozoides móviles y características de su motilidad (Peña, 1997; Feldman y Nelson, 2007).

- Motilidad objetiva:

Para ello, se utilizan sistemas informatizados de análisis espermático. En los últimos años se ha incrementado la disponibilidad de los sistemas computerizados de análisis estadísticos, llamados sistemas CASA (Computer Assisted Sperm Analysis). Son una herramienta que permite comparar objetivamente los parámetros seminales y alcanzar un alto grado de precisión, pudiendo incluso establecerse correlaciones entre la calidad del semen y su fertilidad (Peña, 1997; Verstegen y cols., 2002; Rijsselaere y cols., 2012).

El sistema CASA, mediante un análisis y procesado algorítmico de la imagen digital del recorrido de cada espermatozoide, determina la motilidad de una muestra de semen, así como las propiedades de movimiento espermático. Este sistema analiza parámetros de movimiento como son: el movimiento progresivo, velocidad curvilínea media y lineal media, velocidad de trayectoria media y desplazamiento lateral de la cabeza de los espermatozoides (Peña, 1997; Verstegen y cols., 2002; Rijsselaere y cols., 2012).

3.5.2.2. Concentración espermática

La concentración espermática es estimada mediante el recuento total de espermatozoides presentes en el eyaculado (Johnston y cols., 2001).

Es uno de los parámetros de mayor importancia para establecer la fertilidad en un individuo, ya que se le considera un estimador determinante de la calidad del semen (Johnston y cols., 2001).

Su cuantificación es variable en función del volumen recogido, número de espermatozoides producidos por el macho y fracción o fracciones del semen recogidas (Peña, 2004; Root, 2005). Por ello, se deben recolectar las distintas fracciones del semen por separado, y en caso de no ser posible, asumir una variación en su concentración (Hewitt, 2000).

Existen diversos métodos destinados a la medición de la concentración espermática:

- Hemocitómetro (cámara de Neubauer o Bürker):

Es el procedimiento tradicional. La técnica consiste en realizar una dilución del semen con solución salina (habitualmente 1/40), homogeneizarla, colocarla en el interior de la cámara de Neubauer o Bürker y dejarla reposar unos minutos. Posteriormente, se realiza un recuento usando el microscopio con los objetivos de 10X y 40X (Root, 2005; Feldman y Nelson, 2007).

Para hacer el contaje y estimar el número de espermatozoides, existen diferentes protocolos en función del número de cuadrículas contabilizadas y las medidas de las mismas (England y Ponzio, 1996; England, 1999; Root, 2005; Verstegen y cols., 2005).

- Espectofotómetro:

Este sistema se basa en la fotolorimetría para estimar el grado de absorción y dispersión de la luz que producen los espermatozoides contenidos en una microcubeta. Extrapolando los valores de absorbancia a través de los registros obtenidos, y mediante una recta de regresión de referencia se estima la concentración espermática del eyaculado (Peña, 1997; Feldman y Nelson, 2007).

Una variación de este sistema es el contador de partículas o Coulter Counter, basado en sistemas computerizados capaces de reconocer y realizar el contaje de los espermatozoides en función de las características propias de cada especie (Peña, 1997; Feldman y Nelson, 2007).

La concentración media considerada normal de espermatozoides en la fracción espermática del eyaculado en la especie canina, varía en función de los autores, considerándose dentro de lo normal rangos entre 100–700 x 10⁶ espermatozoides/ml (Peña, 1997; Johnston y cols., 2001) o entre 20–200 x 10⁶ espermatozoides/ml (Root, 2005).

El valor de mayor interés en el parámetro de la concentración espermática es conocer la cantidad de espermatozoides totales en el eyaculado. Para ello es necesario multiplicar la concentración espermática por el volumen total de semen recogido (Johnston y cols., 2001; Root, 2005; Feldman y Nelson, 2007). Considerándose los valores totales normales entre los 300-2000 x 10⁶ espermatozoides/eyaculado (Johnston y cols., 2001; Root, 2005).

3.5.2.3. Morfología y viabilidad espermática

El estudio de la morfología del espermatozoide incluye todas aquellas alteraciones que pueden aparecer en las distintas partes que lo conforman: cabeza, pieza intermedia y cola (Johnston y cols., 2001).

Estas anomalías pueden ser debidas a múltiples causas, siendo las más habituales: infecciones del tracto reproductivo, incremento de la temperatura corporal, alteraciones iatrogénicas, trauma testicular, disminución de la secreción de LH o de la testosterona (Johnston y cols., 2001) y un largo periodo de reposo sexual (Kawakami y cols., 1998).

Las anomalías pueden ser (Root, 2005; Feldman y Nelson, 2007):

- Primarias: son anomalías de la cabeza, como pueden ser el tamaño, forma inusual, un número abundante de cabezas sueltas y anomalías de la pieza intermedia, apareciendo con forma curvada y/o presencia de gotas citoplasmáticas proximales.
- Secundarias: son producidas en la fase de tránsito por el sistema ductal del epidídimo, durante la maduración de los espermatozoides. Observándose gotas citoplasmáticas distales en la pieza intermedia y colas curvadas o enrolladas.

La alteración de la morfología de los espermatozoides determina la motilidad de los mismos (Root, 2005).

En general, según el autor consultado, el porcentaje de espermatozoides sin anomalías morfológicas debe ser superior o igual al 80% (Johnston y cols., 2001) o superior a un 70% (Root, 2005; Feldman y Nelson, 2007).

Algunos trabajos han intentado relacionar la fertilidad con el porcentaje de anomalías morfológicas de los espermatozoides, estableciendo que el nivel de éxito de un eyaculado disminuye a medida que se incrementa la cantidad de espermatozoides anormales en el mismo, estimándose que la fertilidad es significativamente inferior cuando el porcentaje de morfoanomalías supera el 60% (Johnston y cols., 2001).

Las técnicas existentes para valorar la morfología de los espermatozoides son muy variables (Root, 2005; Feldman y Nelson, 2007), el método más sencillo consiste en tomar una gota de semen fresco con solución salina formolada y depositarlo entre un portaobjetos y un cubreobjetos con el fin de tomar una fina capa de espermatozoides que pueda ser valorada sin coloración mediante microscopía de contraste de fases (Root, 2005; Feldman y Nelson, 2007).

En la actualidad, se utilizan otras técnicas más específicas basadas en la realización de frotis seminales y su combinación con determinadas tinciones que permiten evaluar las características morfológicas de los espermatozoides, como pueden ser la integridad de la membrana plasmática, el estado de capacitación y la reacción acrosomal. Las tinciones más habitualmente utilizadas son: eosina-nigrosina, Wright-Giemsa o Diff Quick (Root, 2005; Feldman y Nelson, 2007).

Algunos estudios, más recientes, utilizan la tinción Spermac® para la evaluación de la morfología espermática, ya que permite efectuar una

evaluación detallada de las alteraciones de los diferentes segmentos de espermatozoides incluyendo el acrosoma (Goericke-Pesch y Failing, 2013).

Por otra parte, las tinciones fluorescentes, permiten el examen de las características de los espermatozoides sin necesidad de inmovilizarlos, utilizándose en la citometría de flujo y en los análisis mediante el uso de sistemas como el CASA, con los que se obtiene una información más detallada y objetiva de las características morfológicas (Rijsselaere y cols., 2004; Verstegen y cols., 2005).

Con respecto al estudio de la viabilidad espermática, este consiste en la determinación del porcentaje de espermatozoides que presentan las membranas espermáticas intactas o alteradas (Peña, 1997; Rijsselaere y cols., 2004).

En general, se considera que el porcentaje de espermatozoides con membranas intactas en un eyaculado normal debe ser superior al 90% (Peña, 1997; Rijsselaere y cols., 2004).

La principal técnica utilizada para valorar el porcentaje de espermatozoides muertos o con la membranas dañadas es la utilización de tinciones supravitales, elaboradas a partir de colorantes vitales como la eosina-nigrosina, eosina-azul anilina o trypan blue capaces de teñir a los espermatozoides en función de la integridad y permeabilidad de la membrana plasmática (Peña, 2004).

Otros estudios han demostrado la eficacia de los sistemas computerizados para determinar la viabilidad espermática del semen canino. Estos sistemas estiman rápidamente la calidad del semen a través del análisis simultáneo de miles de células en una misma muestra, utilizando, por ejemplo, sistemas de citometría de flujo unido a combinaciones de diferentes tinciones de fluorescencia (Rijsselaere y cols., 2004; Nizański y cols., 2012).

El uso de los fluorocromos para la detección de la integridad de la membrana plasmática parece ser la técnica más sensible, en comparación con los métodos convencionales, para valorar la viabilidad espermática. Además tiene la ventaja de poder ser útil para detectar la población de espermatozoides moribundos. Estos sistemas se han desarrollado para analizar las características del semen refrigerado y criopreservado-descongelado (Nizański y cols., 2012). Se basan en el uso de la combinación de diferentes fluorocromos como son el diacetato de carboxifluoresceína con yoduro de propidio (YP), el SYBR-14 con YP, el carboxi-SNARF con YP, calceína-AM con homodímero de etidio (EthD-1) (Nizański y cols., 2012).

Otro de los métodos desarrollados para determinar la integridad de la membrana espermática es el test hiposmótico, que es una de las pruebas indirectas más frecuentemente utilizadas para evaluar la integridad de la membrana espermática en el hombre (Jeyendran y cols., 1984; Fazano y cols., 1993; Oosterhuis y cols., 1996), toro (Correa y Zavos, 1994), verraco (Lechniak y cols., 2002), caballo (Neild y cols., 1999; Nie y Wenzel, 2001) y el perro (England y Plummer,

1993; Kumi-Diaka, 1993; Goericke-Pesch y Failing, 2013) debido a su fiabilidad y repetibilidad (Martins-Bessa y cols., 2006).

Consiste en la inmersión de los espermatozoides en un medio hiposmótico, donde los espermatozoides que tienen la membrana plasmática intacta se hincharán y su cola se enrollará, debido a la entrada del fluido en su interior (Jeyendran y cols., 1984).

Esta técnica presenta la desventaja de que hasta la actualidad no hay un protocolo normalizado ni unos valores de referencia fiables bien definidos. A pesar de ello, el test hiposmótico se considera un método sencillo, accesible y útil que complementa y mejora el análisis estándar de semen canino, permitiendo obtener información adicional acerca del estado de la membrana de los espermatozoides y, posiblemente, también su capacidad de fertilización (Goericke-Pesch y Failing, 2013; Karger y cols., 2014).

3.5.2.4. Estado del acrosoma

El acrosoma es una estructura situada en la mitad anterior de la cabeza del espermatozoide, del que va a depender el fenómeno de capacitación espermática (England y Ponzio, 1996).

En la especie canina, tiene una forma acuminada a modo de capuchón, y las alteraciones más frecuentes son acrosomas desprendidos o prominentes (England y Ponzio, 1996).

En general, se ha determinado que el porcentaje de acrosomas sin alteración en el semen fresco canino debe situarse entre el 85 y el 95% (England y Ponzio, 1996).

En la especie canina, se pueden utilizar diversas técnicas para evaluar el estado de los acrosomas como son las tinciones para microscopio de campo claro, los marcadores fluorescentes, el test de endósmosis y el estudio de muestras seminales con microscopía de contraste de fase o interferencia de contrastes (Peña, 1997). Los marcadores utilizados en estas técnicas son lectinas, tales como la aglutinina de cacahuete de hipogaea, la aglutinina de Pisum sativum o la combinación de fluorocromos como el isotiocianato de fluoresceína, la ficoeritrina o el Alexa Fluor® (Nizański y cols., 2012).

En la actualidad, la tendencia es utilizar métodos más sofisticados y objetivos como son las tinciones fluorescentes analizadas a través del uso de microscopía fluorescente o citometría de flujo, que permiten discriminar perfectamente los acrosomas intactos de los alterados (Peña, 2004; Nizański y cols., 2012), y permiten el estudio de la funcionalidad mitocondrial, del fenómeno de apoptosis, la peroxidación lipídica y la detección de los cambios en la estructura de la cromatina del ADN (Nizański y cols., 2012).

3.5.3. Estudio bioquímico

Los parámetros que se valoran son el pH y la presión osmótica seminal. Para determinar el pH del eyaculado se utiliza la tercera

fracción del mismo (fracción prostática) (Johnston y cols., 2001). El valor normal se encuentra en un rango de 6.3 a 6.7 (Hewitt, 2000; Johnston y cols., 2001). Un aumento de este valor indica alteraciones como la existencia de una eyaculación incompleta o de patologías de origen inflamatorio a nivel testicular, de epidídimo o de la glándula prostática (Feldman y Nelson, 2007).

La presión osmótica se considera un parámetro de interés debido a la intensa relación entre la osmolaridad y el punto crioscópico o de congelación del semen. Los valores de osmolaridad en el perro alcanzan registros de 300 mOsm de concentración, cuando el punto crioscópico de la muestra se sitúa en -0.55°C (Peña, 1997).

3.6. Ecografía Doppler

3.6.1. Características del flujo sanguíneo

El flujo sanguíneo normal puede ser laminar o tubular (Fig. 3).



Figura 3. Representación de los patrones de flujo sanguíneo: A. En el flujo laminar, las mayores velocidades están en el centro del vaso; B. En el flujo tubular, todas las velocidades son iguales.

En el flujo laminar, la velocidad varía en función de la distancia entre las paredes del vaso, las mayores velocidades se producen en el centro del vaso y las menores en su periferia (Williamson, 1998; Nyland y cols., 2002). Es el estado normal de la mayoría de los vasos, siendo el flujo que se visualiza en la mayoría de las arterias pequeñas (Williamson, 1998; Nyland y cols., 2002).

En el flujo tubular o cilíndrico la velocidad no varía en todo el vaso, por lo que la velocidad media es la mitad de su velocidad máxima (Williamson, 1998). Es el flujo observado en grandes vasos (Williamson, 1998; Nyland y cols., 2002).

El flujo también puede ser pulsátil o continuo. Se denomina flujo pulsátil cuando se produce como respuesta a eyecciones periódicas de sangre desde el corazón, observándose en arterias y arteriolas. El flujo es continuo, cuando la velocidad del mismo no varía con el tiempo, siendo el tipo de flujo de las venas (Williamson, 1998).

El volumen del flujo se puede obtener multiplicando la velocidad media por πr^2 (área de sección transversal del vaso) (Williamson, 1998).

3.6.2. Principios de la ecografía Doppler

El efecto Doppler fue descrito por Johann Doppler en 1842, se produce cuando hay un cambio de frecuencia de una onda producida por el movimiento relativo de la fuente respecto a su observador.

La ecografía Doppler utiliza los cambios en la frecuencia del sonido producidos por las células sanguíneas en movimiento. Su fundamento se basa, en que una onda de sonido con una frecuencia conocida es dirigida hacia las células sanguíneas en movimiento, la onda las golpea y es reflejada hacia el transductor, la frecuencia de la señal de retorno variará en función de la velocidad de dichas células y del ángulo con el que incide el sonido sobre el vaso (Williamson, 1998; Kremkau, 2006) (Fig. 4). De forma que si las células sanguíneas se dirigen hacia el transductor, la frecuencia de los ecos que regresan será mayor que la de los ecos transmitidos, y si las células se alejan del transductor, los ecos reflejados serán de menor frecuencia (Nyland y cols., 2002; Kremkau, 2006).

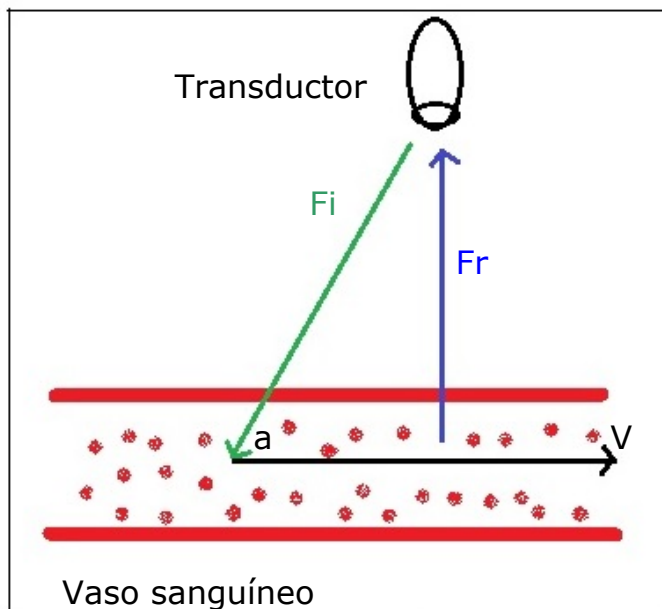


Figura 4. Esquema del efecto Doppler: la onda incidente (F_i) y la reflejada (F_r) producen una variación de frecuencia, que es proporcional a la velocidad (V) de los hematíes y al coseno del ángulo (a) formado entre el haz de ultrasonidos y la dirección del flujo sanguíneo.

La diferencia entre las frecuencias emitidas y recibidas se conoce como cambio de frecuencia o señal Doppler. Cuanto mayor es el cambio Doppler, mayor es la velocidad. Sin embargo, el cambio Doppler no será tan grande si el haz transmitido no es paralelo al flujo sanguíneo, por lo que se tiene que aplicar un factor de corrección que tenga en cuenta el ángulo de incidencia del eco emitido (Nyland y cols., 2002; Kremkau, 2006).

El cambio de frecuencia Doppler se determina por la siguiente fórmula (Williamson, 1998):

$$D = \frac{2 f V \cos \theta}{M}$$

D = frecuencia de la señal Doppler

f = frecuencia del sonido del transductor

V = velocidad de flujo

θ = ángulo de incidencia entre el haz y el vaso

M = velocidad del sonido en los tejidos examinados

Durante la medición de la velocidad de flujo sanguíneo es importante mantener el ángulo entre el transductor y el vaso lo más pequeño posible, ya que los ángulos entre 60° y 90° dan lugar a errores en el cálculo del cambio de frecuencia Doppler, y por tanto, en la velocidad de la sangre. Por ello, el ángulo entre el transductor y el vaso

debe ser menor de 60° , siempre que sea posible (Williamson, 1998; Lamb y Boswood, 2005).

Los datos Doppler recogidos aparecen como un espectro, donde horizontalmente se representa el tiempo y verticalmente la velocidad de flujo (cm/s) o la diferencia de frecuencia (kHz) (Nyland y cols., 2002).

Las medidas de los flujos dan una información indirecta sobre la resistencia vascular periférica (Nyland y cols., 2002).

Por convención, el trazo espectral se sitúa siempre por encima de la línea base cuando el flujo se dirige hacia el transductor y por debajo de la línea base cuando se alejan del transductor (Nyland y cols., 2002).

Como la frecuencia de los ecos reflejados se compara con la frecuencia original del eco emitido, dicha diferencia se encuentra normalmente en el rango de kilohertz y es audible cuando se envía al altavoz de la unidad Doppler (Nyland y cols., 2002; Lamb y Boswood, 2005).

En el Doppler color los diferentes colores indican cuántas células sanguíneas se mueven y la velocidad que llevan (Williamson, 1998; Nyland y cols., 2002).

3.6.3. Tipos de ecografía Doppler

3.6.3.1. *Doppler continuo*

Es el sistema más básico en el que el sonido se emite de forma continua. El transductor tiene un elemento emisor y otro que recibe la onda, y contiene un demodulador que compara la frecuencia de las ondas transmitidas con la de las ondas recibidas y computa la diferencia. Los filtros eliminan los cambios Doppler de baja frecuencia, que pueden ser debidos a la respiración o al movimiento pulsátil del vaso (Williamson, 1998; Lamb y Boswood, 2005).

Un inconveniente de este tipo de onda, es que no distingue entre varios vasos dentro de una misma área, ya que cualquier movimiento dentro de la trayectoria analizada por los transductores emisor y receptor produce un cambio Doppler. Tampoco permite obtener información de estructuras profundas ya que no puede distinguir la profundidad de las mismas (Williamson, 1998; Lamb y Boswood, 2005). Sin embargo, sí puede determinar la dirección del flujo y medir velocidades de flujo mayores que el Doppler pulsado, ya que emite ecos de forma continua, sin que exista tiempo en vacío en espera de los ecos reflejados (Nyland y cols., 2002). Por ello, este tipo de sistema es más útil para vasos superficiales o para captar señales débiles (Williamson, 1998; Lamb y Boswood, 2005).

Resulta una técnica muy útil para el cálculo de la medida de la velocidad de flujo en corazón y grandes arterias y en el diagnóstico de

determinadas patologías vasculares como la estenosis aórtica (Lamb y Boswood, 2005).

3.6.3.2. Doppler pulsado

En este caso, el transductor solamente tiene un elemento que emite y recibe el sonido, siendo parecido a los sistemas no-Doppler (Williamson, 1998; Lamb y Boswood, 2005).

El sonido se envía repetidamente en ráfagas o pulsos cortos y entre ellos hay un silencio en el que el sistema espera el retorno del eco (Williamson, 1998; Lamb y Boswood, 2005).

La profundidad del tejido examinado, está determinada por la variación en el tiempo transcurrido desde que se transmite el sonido hasta su retorno al receptor (Williamson, 1998; Lamb y Boswood, 2005).

La longitud del tejido explorado, o también llamada longitud puerta (Williamson, 1998) o rango ventana (Nyland y cols., 2002), se determina por el tiempo durante el cual el receptor está funcionando, es decir el rango en el cual la ventana o puerta se abre o se cierra para aceptar sólo ecos de una profundidad concreta (Nyland y cols., 2002).

La frecuencia de repetición de pulso (FRP), es la frecuencia con la que se emiten los pulsos del sonido. El teorema de Nyquist establece que la FRP debe ser el doble de la frecuencia Doppler, si no es así se

pueden producir errores en el cálculo y en la reconstrucción de las curvas Doppler (Willimason, 1998).

La FRP debe ser lo suficientemente alta como para examinar el vaso correctamente y que la información Doppler sea correcta. Cuanto mayor sea la FRP, menor será la profundidad del examen (Williamson, 1998). Si no se aplica una correcta FRP se produce un artefacto denominado aliasing (Nyland y cols., 2002).

Para medir la velocidad de la sangre mediante Doppler, se pueden utilizar dos tipos de métodos (Williamson, 1998):

- Velocidad máxima, donde el volumen de la muestra es aproximadamente la mitad del tamaño del vaso. En esta medición el volumen muestra se coloca en el centro del vaso. Y para evitar una sobreestimación, ya que en el centro del vaso la velocidad es mayor, la medida del flujo debe multiplicarse por 0.57.
- Insonación, donde el volumen muestra incorpora toda la luz del vaso.

3.6.3.3. Doppler color

Funciona de forma parecida al Doppler pulsado. El color se designa de modo arbitrario en base a que el flujo se acerque o se aleje del transductor (Williamson, 1998).

En el Doppler color la imagen se puede considerar dividida en píxeles. En cada píxel se detecta el flujo, sin que se corrija por la angulación, y la velocidad de las estructuras que se mueven en el píxel. En función de dichas velocidades, se asigna un color a cada píxel examinado (Williamson, 1998).

El grado de saturación del color también indica la velocidad de las células sanguíneas. El flujo que se dirige hacia el transductor se puede representar con los colores amarillo, naranja o rojo y cuando son velocidades muy grandes en color amarillo-blanco. Si el flujo se aleja del transductor se suele evidenciar con los colores azul o verde y en su caso las velocidades más altas de color verde-blanco (Nyland y cols., 2002).

La frecuencia de cambio en este sistema se determina por el uso de una técnica llamada detección de la cuadratura, con la que se determina la dirección del flujo (Williamson, 1998).

Los cambios de frecuencia se determinan comparando la señal de retorno con una referencia y determinando la cantidad de cambios de fase de la onda. Lo cual se consigue utilizando una técnica llamada autocorrelación. El conjunto de cambios de frecuencia indica la velocidad media de cada píxel (Williamson, 1998).

El Doppler color tiene dos desventajas fundamentales, que sólo representa la velocidad media de un área determinada, y que la velocidad máxima que se puede detectar es limitada. Otra desventaja

es que depende del ángulo de eco transmitido con respecto al vaso en estudio, por lo que puede producirse aliasing, artefactos de ruido o ser incapaz de representar el espectro Doppler entero. Por todo ello, el Doppler color no tiene una precisión tan buena como la del Doppler convencional pulsado o continuo (Nyland y cols., 2002).

3.6.3.4. Doppler potenciado (Power Doppler)

El Doppler potenciado es un método que difiere del Doppler color en que analiza el cambio en la amplitud de los ecos, en lugar del cambio de frecuencia. Se relaciona por ello con la densidad de los glóbulos rojos en la muestra y no con su velocidad (Zwiebel y Pellerito, 2005).

Comparado con el Doppler color, el Doppler potenciado es más sensible detectando flujos sanguíneos lentos y débiles, y permite evaluar la vascularización tisular ya que depende menos del ángulo Doppler, por lo que detecta mejor los vasos más pequeños y con menor flujo, así como los contornos de la luz del vaso (Zwiebel y Pellerito, 2005).

3.6.3.5. Sistema Dúplex

Es aquel en el que se obtiene información Doppler y en modo B al mismo tiempo, ya que combina la ecografía en tiempo real bidimensional con escala de grises y la ecografía Doppler de forma simultánea (Nyland y cols., 2002).

Generalmente la frecuencia Doppler es más baja que la de modo B, lo cual minimiza el aliasing en el modo Doppler y maximiza la resolución. Pero el uso de esta baja frecuencia no da una detección tan buena del flujo lento como la que daría un transductor de alta frecuencia (Williamson, 1998).

3.6.4. Aplicaciones clínicas de la ecografía Doppler

Mediante la ecografía Doppler podemos realizar un estudio cualitativo, cuantitativo y semicuantitativo del vaso sanguíneo.

3.6.4.1. *Estudio cualitativo*

Da información de la existencia de un flujo sanguíneo. Y según sus características el flujo puede ser arterial o venoso (Günzel-Apel y cols., 2001):

- a) Flujo arterial: existen tres tipos de patrones de flujo sanguíneo arterial:
 - De alta resistencia: caracterizado por un pico sistólico afilado y un flujo de diástole temprano y reverso. Presentando un patrón de flujo tri- o bifásico (Fig. 5). Este patrón se presenta en la arteria aorta.

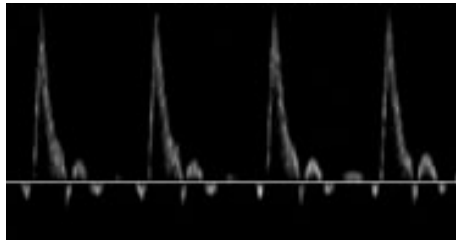


Figura 5. Imagen de un flujo espectral de alta resistencia bifásico.

- De baja resistencia: caracterizado por un amplio pico sistólico continuo y por una velocidad diastólica alta que disminuye gradualmente. Su curva espectral muestra un patrón monofásico. Es típico de arterias que irrigan órganos que tienen una demanda continua de sangre, como en el caso de la arteria renal (Fig. 6).

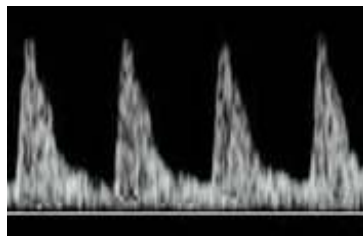


Figura 6. Imagen de un flujo espectral de baja resistencia.

- De resistencia intermedia: caracterizado por un pico sistólico afilado (más ancho que en las arterias de alta resistencia) y un flujo bajo en diástole sin reverso (Fig. 7). Se observa en la arteria mesentérica craneal y la arteria celiaca.

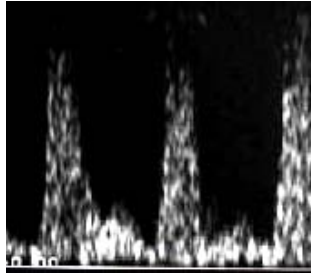


Figura 7. Imagen de un flujo espectral de resistencia media.

b) Flujo venoso: es un flujo laminar. Las condiciones de presiones intratorácicas e intraabdominales durante la inspiración y la espiración influyen en la velocidad del flujo y produce cambios en la imagen espectral de las venas, como sucede en la vena porta (Fig. 8).

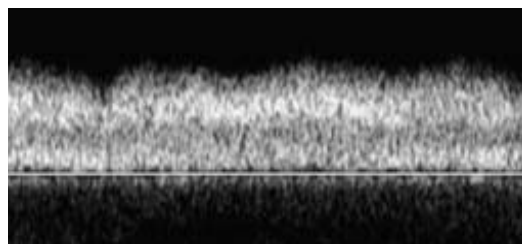


Figura 8. Imagen del flujo espectral venoso de la vena porta.

En otros vasos, como la vena cava caudal, los cambios en la imagen espectral son debidos a la presión ejercida en la aurícula derecha durante ciclo cardiaco.

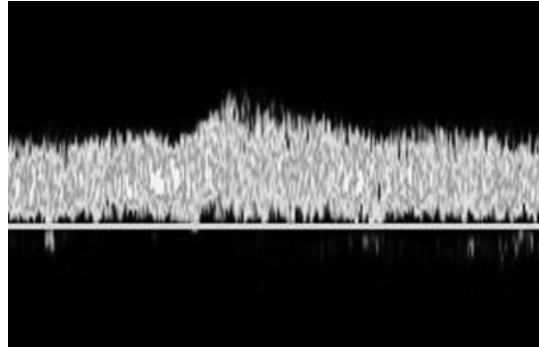


Figura 9. Imagen del flujo espectral venoso de la vena cava caudal.

3.6.4.2. Estudio cuantitativo

Con este estudio obtenemos la medición de la velocidad de flujo, VPS, VFD y la velocidad media. Ya que la frecuencia de retorno de los ecos es igual a la velocidad, conociendo el ángulo Doppler (Williamson, 1998).

3.6.4.3. Estudio semicuantitativo

A partir del estudio semicuantitativo se pueden obtener una serie de índices, que reflejan las características principales de la onda Doppler, obteniéndose a partir de ratios de la VPS, VFD y la velocidad media a través de un ciclo cardiaco (Williamson, 1998; Zwiebel y Pellerito, 2005), y son:

- A/B ratio: o también llamado razón sistólica / diastólica.

- IR o índice de Pourcelot, cuya fórmula es:

$$IR = \frac{VPS - VFD}{VPS}$$

- IP:

$$IP = \frac{VPS - VFD}{\text{Velocidad media}}$$

Los valores más utilizados son el IR e IP. Los valores normales para cada uno de estos índices varían según la arteria en estudio y no están influidos por la medida del ángulo del flujo (Williamson, 1998; Zwiebel y Pellerito, 2005).

3.6.5. Errores y artefactos Doppler

3.6.5.1. *Toma incorrecta del ángulo de flujo*

Muchos vasos son tortuosos o curvos, siendo difícil precisar la medida del ángulo (Williamson, 1998).

Del mismo modo, sucede en grandes arterias que al ser más elásticas y cambiar de diámetro durante la sístole se pueden producir grandes errores (Williamson, 1998).

Los errores pequeños no son importantes en ángulos menores de 60° , pero pueden ser más importantes en ángulos entre 60° y 90° (Williamson, 1998).

3.6.5.2. *Aliasing*

Es un error frecuente en el cálculo del cambio de frecuencia Doppler en el Doppler pulsado. Si la FRP es demasiado baja (menos de dos veces la frecuencia de la señal de cambio de Doppler reflejada) y la velocidad del flujo excede el límite de Nyquist, parte de la señal Doppler es representada en el espectro por debajo de la línea base, apareciendo como si fuera el flujo en dirección contraria al transductor (Szatmari y cols., 2001; Lamb y Boswood, 2005) (Fig. 10).

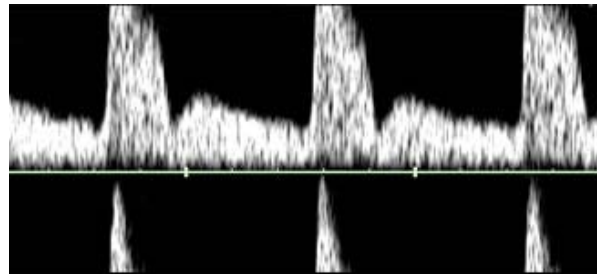


Figura 10. Trazado espectral en el que se puede observar aliasing. El punto más alto de la onda está oculto y es representado en la base del trazado.

Es un artefacto fácil de reconocer ya que las porciones de alta velocidad del trazado Doppler se malinterpretan como de baja velocidad y en dirección incorrecta (Williamson, 1998).

Este tipo de error no se produce en el Doppler continuo (Williamson, 1998), aunque puede darse en el Doppler color, pudiéndose confundir con un flujo inverso, aunque el verdadero flujo inverso presenta una zona sin flujo entre la sangre que avanza y el flujo de sangre inverso. En ese caso, este error se puede minimizar cambiando la escala del Doppler color, usando un transductor de baja frecuencia o haciendo la puerta de flujo lo más pequeña posible (Williamson, 1998; Lamb y Boswood, 2005).

3.6.5.3. *Uso de una FRP alta*

Cuando la FRP es demasiado alta, puede ocurrir que no se reciban en el transductor todos los ecos antes del envío de un nuevo pulso. De esta forma, si regresa un eco del primer pulso después de hacerlo el eco del segundo pulso, el aparato deduce que el primer eco procede de una localización superficial, por la aparente rapidez del tiempo de viaje, cuando realmente procede de un plano más profundo (Williamson, 1998).

3.6.5.4. *Imagen especular*

Un artefacto en espejo en el Doppler espectral se produce cuando un reflector grande es posterior al vaso examinado, dando lugar a un vaso imaginario situado más profundamente al vaso real (Williamson, 1998).

Aparece como una señal, casi siempre simétrica, a ambos lados de la línea basal (Williamson, 1998) (Fig. 11).

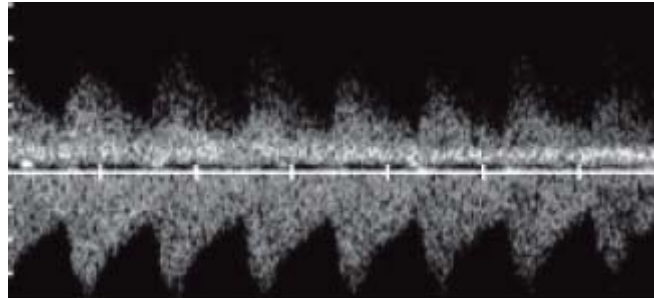


Figura 11. Trazado espectral que muestra el aspecto de una imagen en espejo.

Se produce con el uso de alta ganancia del receptor, cuando la señal alta confunde al circuito de dirección-detección. También cuando se utilizan ángulos de 90° o señales de baja ganancia, y el ecógrafo duda en la determinación de la verdadera dirección del flujo sanguíneo (Williamson, 1998).

3.6.5.5. *Interpretación errónea*

En el Doppler color otro error frecuente es asumir que todos los vasos de un color son arterias y los de otro color son venas (Williamson, 1998).

Es importante recordar que el color está únicamente determinado por la dirección del flujo hacia el transductor o su alejamiento (Williamson, 1998).

3.6.6. Ecografía Doppler de los testículos

En humana, el examen ecográfico de los vasos sanguíneos de los testículos ha sido ampliamente descrito (Horstman y cols., 1991). Sin embargo, en la especie canina pocos estudios se han realizado a este respecto.

El flujo arterial en los testículos y cordón espermático del perro ha sido estudiado, no así el del epidídimo (Nyland y cols., 2002).

En la especie canina el patrón del flujo sanguíneo típico de las arterias testiculares es un patrón monofásico de baja resistencia que no depende de la edad y la raza (Günzel-Apel y cols., 2001; Gumbsch y cols., 2002). Se han encontrado correlaciones con el peso, el pulso y el volumen testicular, de forma que los perros de mayor peso presentan testículos más grandes, con vasos de mayor diámetro y mayor flujo sanguíneo (Gumbsch y cols., 2002).

Para el estudio de las arterias testiculares en el perro, el volumen de la muestra debe abarcar toda la luz del vaso sanguíneo, pudiendo variar entre 2-4 mm (Williamson, 1998).

En humana se observa que el espectro de la arteria capsular y de las arterias intratesticulares es similar y de apariencia relativamente constante. Sin embargo, la arteria supratesticular presenta una apariencia mucho más variable ya que en su recorrido por el cordón espermático discurren junto a ella, la arteria deferencial y cremastérica,

observándose en dicha área un flujo de alta resistencia, en contraste con el flujo de baja resistencia que presenta la arteria supratesticular a nivel del borde craneal del testículo (Middlenton y cols., 1989).

Los valores cuantitativos y semicuantitativos del flujo sanguíneo de las arterias testiculares en la especie canina obtenidos por los diferentes autores quedan reflejados en la Tabla 1.

En el perro los valores de VPS más altos han sido observados en la arteria supratesticular y los más bajos en las arterias intratesticulares (Gumbsch y cols., 2002). Otros autores encuentran un valor estadísticamente significativo mayor de este parámetro en la arteria marginal que en la arteria supratesticular (Günzel-Apel y cols., 2001) o no observan diferencias significativas entre estas dos arterias (Souza y cols., 2014). En otras especies se describe una disminución gradual estadísticamente significativa del valor de la VPS en la arteria supratesticular desde la zona más cercana al cordón espermático hacia el borde craneal del testículo (Middlenton y cols., 1989; Pozor y McDonnell, 2004).

Tanto en el hombre (Middlenton y cols., 1989) como en el perro (Souza y cols., 2014), los valores de VFD son mayores en la arteria marginal que en la arteria supratesticular. Sin embargo en el IR e IP, los valores mayores han sido obtenidos en la arteria supratesticular (Middlenton y cols., 1989; Günzel-Apel y cols., 2001; Gumbsch y cols., 2002; Pozor y McDonnell, 2004; Souza y cols., 2014).

Tabla 1. Valores de VPS, VFD, IR e IP del flujo sanguíneo de las arterias testiculares en el perro.

PARÁMETROS		<i>Günzel-Apel y cols</i> (2001)	<i>Gumbsch y cols</i> (2002)	<i>Souza y cols</i> (2014)
VPS (cm/s)	AS	16.03 ± 2.49	36 ± 0.16	12.26 ± 1.61
	AM	20.88 ± 3.86	22 ± 0.07	12.58 ± 1.06
	AI	-	13 ± 0.06	-
VFD (cm/s)	AS	7.85 ± 1.18	15 ± 0.08	5.41 ± 1.18
	AM	11.31 ± 1.89	11 ± 0.04	7.59 ± 1.07
	AI	-	6 ± 0.03	-
IR	AS	0.50 ± 0.04	0.57 ± 0.10	0.55 ± 0.08
	AM	0.45 ± 0.08	0.49 ± 0.09	0.39 ± 0.09
	AI	-	0.47 ± 0.13	-
IP	AS	0.74 ± 0.11	1 ± 0.28	0.91 ± 0.24
	AM	0.60 ± 0.13	0.78 ± 0.24	0.52 ± 0.19
	AI	-	0.75 ± 0.28	-

AS= Arteria Suprtesticular; AM= Arteria Marginal; AI= Arterias Intratesticulares
VPS= Velocidad del Pico Sistólico; VFD= Velocidad al Final de la Diástole; IR= Índice de Resistividad; IP= Índice de Pulsatilidad.

3.6.6.1. Aplicación de la ecografía Doppler como predictor de la espermatogénesis

En medicina humana, la ecografía Doppler se utiliza de manera rutinaria para hacer estudios andrológicos (Middlenton y cols., 1989; Dubinsky y cols., 1998), ya que es un método simple y preciso para medir el flujo sanguíneo y permite combinar la información anatómica con los parámetros dinámicos del flujo sanguíneo (Atila y cols., 1997).

En el hombre la cantidad y calidad de semen se ha observado que depende del estado de la perfusión sanguínea del parénquima testicular (Herwig y cols., 2004). El Doppler color es el procedimiento más adecuado para medir el flujo sanguíneo intratesticular (Atila y cols., 1997), y el estudio en concreto del IR parece ser un indicador de la espermatogénesis (Pinggera y cols., 2008). Biagotti y cols. (2002) concluyen que los valores del IR y la VPS son un método fiable para identificar la infertilidad y dispermia en el hombre. Y permiten diferenciar la azospermia obstructiva de la no obstructiva. Sin embargo, a pesar de su utilidad en pacientes azospérmicos, el estudio del flujo sanguíneo testicular no parece ser útil para predecir la recuperación espermática en estos pacientes (Har-Toov y cols., 2001).

En el conocimiento de los autores existen pocos estudios andrológicos en el perro que relacionen la calidad seminal con la evaluación Doppler de las arterias testiculares. Gumbsch y cols. (2002) evalúan el flujo sanguíneo testicular (arteria supratesticular, marginal e intratesticulares) en condiciones normales, y otros autores han

estudiado el flujo sanguíneo de la arteria supratesticular (Günzel-Apel y cols., 2001) y marginal (Günzel-Apel y cols., 2001; Buming y cols., 2007) en estados patológicos (neoplasia, orquitis y quistes intratesticulares). Solamente se han encontrado dos trabajos que relacionen las características reproductivas y seminales del perro con el flujo sanguíneo de los testículos (Bright y England, 2011; Zelli y cols., 2013b).

MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Los estudios de la presente Tesis Doctoral fueron realizados en las instalaciones del Hospital Clínico Veterinario de la Fundación Veterinaria de la Universidad de Murcia (FUVEUM) y del Departamento de Medicina y Cirugía Animal de dicha universidad.

4.1. Material

4.1.1. Material animal

En este estudio se han utilizado cinco machos adultos de especie canina y raza beagle, con edad media de 4 ± 1 años (rango de edad 3–5 años) y un peso medio de 18.8 ± 3.03 Kg (rango de peso 16–23 Kg). Estos animales se encontraban en perfectas condiciones sanitarias, de vacunación y libres de enfermedades infectocontagiosas.

Los animales utilizados pertenecían al grupo de Investigación de Cirugía, Diagnóstico por Imagen y Anestesia Veterinaria, procediendo del animalario de la Universidad de Murcia, centro usuario autorizado con código RECA ES 300305440012 y cumpliendo la normativa reflejada en el RD 53/2013, del 1 de Febrero, sobre protección de los animales

utilizados para experimentación y otros fines científicos, BOE nº 34, del 8 de Febrero del 2013.

Antes de comenzar la experiencia, los animales fueron sometidos a un periodo de adiestramiento de seis meses. En este tiempo se realizaron semanalmente recogidas seminales y exámenes ecográficos de los testículos, con el fin de que se familiarizaran con el personal investigador y las técnicas a realizar.

Las muestras de semen obtenidas en este periodo fueron evaluadas para confirmar que los animales no presentaban alteraciones seminales y eran válidos para el estudio.

Durante toda la experiencia los animales permanecieron en jaulas individuales y se les alimentó con pienso para perros adultos de gama alta de la marca Royal Canin.

4.2. Métodos

4.2.1. Examen ecográfico Doppler

El examen ecográfico de los testículos se realizó empleando un ecógrafo (Logiq™500 Proseries, General Electric Medical System, Milwaukee, Wisconsin, USA) con una sonda electrónica lineal de 11 MHz.

Durante los estudios ecográficos los animales no fueron sedados para evitar que dicho procedimiento produjera cualquier alteración sobre la posterior evaluación vascular. El animal se colocaba en decúbito supino aplicando gel acústico (Aquasonic®, Parker, U.S.A) para mejorar el contacto entre la sonda y el área a examinar, no siendo necesario rasurar dicha zona.

Se utilizó el Doppler color para localizar la vascularización testicular, y posteriormente el Doppler pulsado para obtener su espectro. Los parámetros vasculares evaluados fueron los establecidos por Gumbsch y cols. (2002):

- VPS: expresado en cm/s
- VFD: expresado en cm/s
- IR: $(VPS - VFD) / VPS$
- IP: $(VPS - VFD) / \text{Velocidad media}$

Para el estudio con ecografía Doppler se realizaban cortes longitudinales (Fig. 12), comenzando en la zona craneal al escroto y posteriormente dirigiendo la sonda caudalmente sobre el testículo. Los vasos sanguíneos en estudio fueron (Gumbsch y cols., 2002):

- arteria supratesticular, en su porción distal, cercana a la cabeza del epidídimo,
- arteria marginal o capsular, localizada dentro de la membrana testicular y que recorre la periferia del testículo,

- y vasos intratesticulares, que se encuentran en el interior del testículo.

El examen Doppler se realizó a partir de cortes longitudinales de los vasos evaluados, y el ángulo entre la onda Doppler y el trayecto de dichos vasos nunca sobrepasó los 60° . Para observar los flujos sanguíneos de menor velocidad, la ganancia de color se ajustó para reducir el exceso de ruidos. La frecuencia de repetición de pulso se estableció baja, siendo de 1.0 a 1.4 kHz en el Doppler color. Durante la medida con el Doppler pulsado el tamaño de la muestra Doppler se mantuvo constante a 2 mm, abarcando la totalidad del vaso.

A lo largo del trayecto de cada arteria en estudio se tomaron tres medidas de cada parámetro en diferentes puntos. Las imágenes fueron archivadas en la unidad central del ecógrafo para su posterior evaluación.

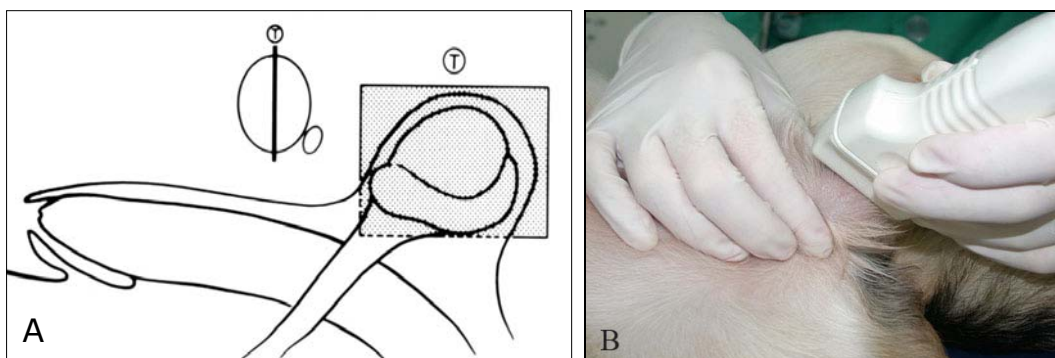


Figura 12. A. Diagrama del plano de corte sagital empleado en la evaluación ecográfica de los testículos (Pugh y cols., 1990) (T: transductor); B. Imagen de la posición del traductor durante el examen ecográfico.

4.2.2. Evaluación seminal

4.2.2.1. *Recogida seminal*

La recogida seminal se realizó de forma individual en una sala aislada y tranquila. El proceso de estimulación y recogida del semen se realizaba siempre en la misma franja horaria y por el mismo personal.

El método de recogida seminal fue manual, consistía en un rápido masaje prepucial, con la mano enguantada, hasta notar que comenzaba la erección en los bulbos del glande, momento en el cuál se retraía totalmente el prepucio detrás de dichos bulbos, abrazando por completo los mismos y manteniendo una presión constante (Fig. 13).



Figura 13. Imagen tomada durante la extracción seminal, en el momento que el pene es rotado caudalmente 180° y se mantiene una presión constante sobre los bulbos del glande hasta que finaliza la recogida del semen.

Las distintas fracciones del eyaculado fueron recogidas de forma individual en distintos recipientes recolectores. Las fracciones pre-espermática y prostática fueron desechadas. La fracción espermática se depositó en un tubo de ensayo milimetrado de 10 ml y se llevó inmediatamente al laboratorio para su evaluación (Fig. 14). Todo el material empleado durante la recogida se encontraba limpio y atemperado (35-37° C).



Figura 14. Material utilizado para la extracción del semen. Se recomiendan colectores de látex y material de vidrio y/o plástico atemperado con bordes redondeados para evitar posibles lesiones.

4.2.2.2. *Contrastación del eyaculado*

Una vez obtenida la fracción espermática del eyaculado se procedió a la evaluación de los siguientes parámetros seminales:

A. Volumen espermático

Se obtiene mediante la visualización directa del tubo graduado de recogida de la fracción espermática y se expresa en ml.

B. Motilidad espermática

Existen diferentes formas de evaluar la motilidad espermática:

a) Motilidad subjetiva

Inmediatamente tras la llegada al laboratorio, fue colocada una gota de la muestra en un porta atemperado, cubriéndose con un cubreobjetos de 24 x 24 Mm (Eurotubo DELTALAB, Alemania).

La motilidad individual y progresiva se estimaba mediante su visualización directa en un microscopio de fases a 40x (Nikon, Labophot. Tokio, Japón) provisto de placa térmica.

La motilidad subjetiva se valoró tres veces en cada muestra.

b) Motilidad objetiva y calidad de movimiento

La evaluación de la motilidad y calidad de movimiento espermático se llevó a cabo mediante el uso de un sistema de análisis computerizado (Integrated Semen Analysis System (ISAS®) CASMA System, Proiser SL, Paterna, Valencia, España), siguiendo el protocolo

descrito por Cremades y cols. (2005). Los parámetros analizados en cada eyaculado fueron los recogidos en la Tabla 2.

Tabla 2. Parámetros de calidad de movimiento de los espermatozoides analizados mediante el sistema ISAS® CASMA.

PARÁMETROS	UNIDADES	DESCRIPCIÓN
Espermatozoides estáticos	%	
Espermatozoides no progresivos	%	
Espermatozoides progresivos	%	
Motilidad total	%	
Motilidad progresiva	%	
Velocidad curvilínea (VCL)	µm/s	Promedio de velocidad de la cabeza espermática a lo largo de su trayectoria real.
Velocidad rectilínea (VSL)	µm/s	Promedio de velocidad de la trayectoria de la cabeza espermática desde la primera hasta la última posición.
Velocidad media (VAP)	m/s	Promedio de velocidad de la cabeza espermática a lo largo de su trayectoria media.
Linealidad (LIN)	%	Linealidad de la trayectoria curvilínea (VSL/VCL x 100).
Rectitud (STR)	%	Rectitud de la trayectoria media (VSL/VAP x 100).
Oscilación (WOB)	%	Grado de oscilación de la trayectoria real de la cabeza espermática respecto a la trayectoria media (VAP/VCL x 100).
Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza espermática (ALH)	µm	Amplitud de las variaciones de la trayectoria real de la cabeza espermática respecto a la trayectoria media.
Frecuencia del desplazamiento de la cabeza espermática o de batido (BCF)	Hz	Frecuencia con la que la trayectoria real se cruza con la trayectoria media.

Para esta evaluación, se realizó una dilución previa de la muestra espermática con un medio isotónico estándar para los espermatozoides (tampón fosfato-sulfato (PBS)) (Tabla 3), hasta obtener una concentración final de 30×10^6 espermatozoides/ml, y posteriormente 5 μ l de la muestra diluida en PBS fueron colocados en una cámara de Mackler (Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel) previamente atemperada en una placa calefactora (Gm Bh HT 400, Minitüb, Alemania) a 38° C.

Tabla 3. Composición del diluyente PBS.

COMPOSICIÓN ¹	PROPORCIÓN
Cloruro sódico	8 gr
Cloruro potásico	0.2 gr
Dihidrógeno-fosfato de sodio	0.12 gr
Hidrógeno-fosfato de sodio EDTA hidratado	1717 gr
EDTA ácido	1 gr
Agua ultrapura	1 L

¹pH medio de 6.78 y osmolaridad media de 285 mOsm/L.
Ajustándose el pH con hidróxido sódico

En cada una de las determinaciones fueron analizados tres campos mediante un microscopio de contraste de fases a 10x (Nikon, Labophot. Tokio, Japón) y una cámara conectada al mismo (Basler Vision Technologies A 312f, Alemania) que a su vez estaba unida a un

ordenador con un software Sperm Class Analyzer (ISAS® CASMA System, Proiser SL, Valencia, España).

C. Viabilidad y morfoanomalías

Los porcentajes de viabilidad y anomalías morfológicas fueron determinados usando una tinción simple de eosina-nigrosina (Tabla 4).

Tabla 4. Composición de la tinción eosina-nigrosina.

COMPOSICIÓN ¹	PROPORCIÓN
Citrato trisódico 3.98%	100 ml
Eosina	2.5 gr
Nigrosina	5 gr

¹ pH= 6.9 disuelto en agua.

Para ello, fueron mezclados 10 µl de semen y 10 µl de la tinción de eosina-nigrosina en un porta biselado, se mezclaban y se hacía una extensión gruesa, dejándose secar al aire para posteriormente cuantificar al microscopio a 100x (Nikon, Labophot. Tokio, Japón).

Fueron contabilizados al menos 200 espermatozoides en cada uno de los casos y el resultado final fue expresado en %.

Los parámetros evaluados fueron:

- número de espermatozoides con las membranas intactas: observándose la cabeza de los espermatozoides sin tinción en su interior cuando los espermatozoides estaban vivos, y con tinción cuando el espermatozoide estaba muerto debido a la alteración de la permeabilidad de la membrana de su cabeza,
- número de espermatozoides morfológicamente anormales: alteración de la cabeza, colas en látigo, en ovillo, gotas proximales y otras anomalías.

D. Concentración espermática:

Para obtener la concentración espermática de la fracción rica se utilizó una cámara de recuento celular Bürker (Zuzi). A efectos prácticos la dilución empleada para fijar los espermatozoides fue de 1/40 en solución formolada (Tabla 5).

Tabla 5. Composición de la solución salina formolada.

COMPOSICIÓN	PROPORCIÓN
Cloruro sódico	9 gr
Formaldehído	3 ml
Agua purificada	1 L
Conservándose en el frigorífico a 4º C	

En cada eyaculado se realizó al menos dos contajes en la cámara de Bürker por el método estándar para determinar el número total de espermatozoides del eyaculado.

4.2.3. Diseño experimental

Para alcanzar los objetivos propuestos se diseñaron dos experiencias.

4.2.3.1. Experiencia 1: Describir la morfología de la onda espectral y establecer los valores de VPS, VFD, IR e IP de las arterias testiculares en el perro.

Se realizó un examen ecográfico Doppler color y pulsado de la vascularización testicular como se ha descrito en el punto 4.2.1. Se hicieron un total de cinco ensayos a cada uno de los animales con un intervalo de una semana entre ellos.

4.2.3.2. Experiencia 2: Establecer la correlación entre los valores del IR de las arterias testiculares con los parámetros seminales de concentración y motilidad espermática en el perro.

Al finalizar la primera experiencia, durante un periodo de 15 semanas consecutivas se realizó semanalmente en cada animal un examen ecográfico Doppler color y pulsado de las arterias testiculares (según lo descrito en el punto 4.2.1), e inmediatamente después la extracción y contrastación seminal. Se obtuvieron un total de 15 ensayos.

Para determinar la existencia de alguna correlación entre los valores del IR de las arterias testiculares con respecto a los parámetros de calidad seminal se realizaron dos estudios estadísticos (Fig. 15):

- Primer ensayo para establecer la existencia de una correlación estadística de los valores del IR con los valores de contrastación seminal del día de la extracción (Tiempo *a*).
- Segundo estudio estadístico para correlacionar los valores del IR obtenidos en el Tiempo *a* con los valores de contrastación obtenidos en el mismo perro, aproximadamente, 62 días más tarde (tras un ciclo espermático) (Tiempo *b*).

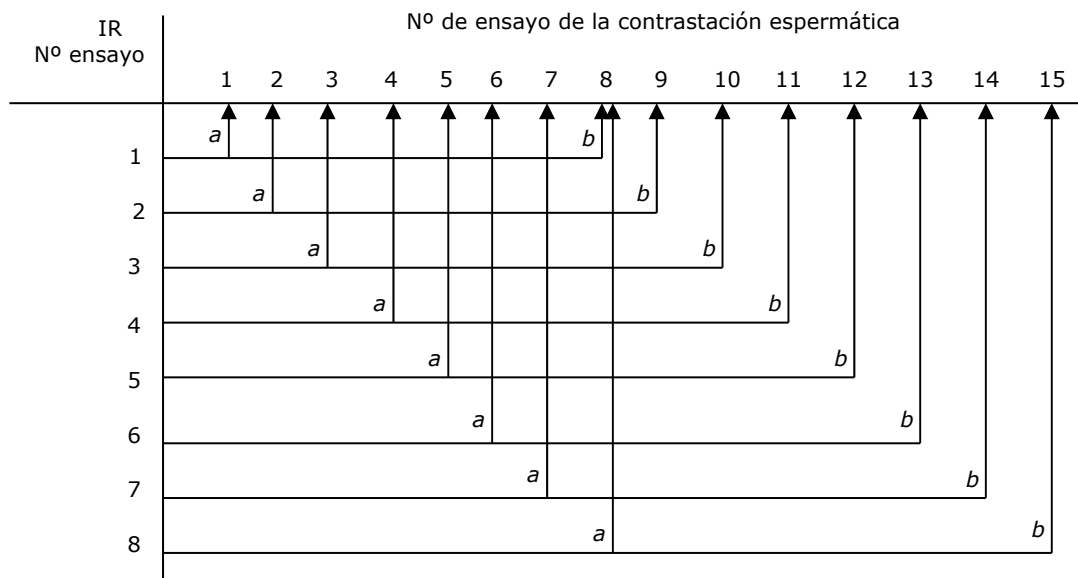


Figura 15. Esquema del diseño experimental, donde "a" se refiere a la correlación entre los valores del IR con los valores obtenidos en la contrastación espermática durante un mismo ensayo y "b" se refiere a la correlación entre los valores del IR con los valores obtenidos tras un ciclo espermático (aproximadamente 62 días).

4.2.4. Análisis estadístico

En todas las experiencias se realizó un análisis estadístico utilizando el SPSS versión 15.0 (SPSS Inc, Chicago, III).

Para la experiencia 1, "Describir la morfología de la onda espectral y establecer los datos de VPS, VFD, IR e IP de las arterias testiculares en el perro": los datos obtenidos de VPS, VFD, IR e IP fueron analizados por un análisis de varianza usando el procedimiento MIXED, siendo los parámetros fijos el testículo y la arteria, y los parámetros aleatorios el perro y su peso. Cuando el análisis de varianza mostraba que los datos eran estadísticamente significativos ($p < 0.05$), estos valores eran comparados usando el test de Bonferroni. Los resultados se presentaron como la media \pm error típico.

En la experiencia 2, "Establecer la correlación entre los valores del IR de las arterias testiculares con los parámetros de concentración y motilidad espermática en el perro": los valores del IR de las arterias testiculares se analizaron por el test de Friedman, con el objetivo de confirmar que dichos valores se mantenían constantes durante los 15 ensayos. La correlación de este índice en cada una de las arterias con los parámetros espermáticos en el Tiempo *a* y *b*, se realizó mediante el coeficiente de Spearman. La correlación se consideró significativa cuando $p < 0.05$. Los resultados se presentaron como media \pm error típico.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Experiencia 1: Describir la morfología de la onda espectral y establecer los valores de VPS, VFD, IR e IP de las arterias testiculares en el perro.

En el período en que duró esta experiencia en ninguno de los cinco perros se observaron anomalías clínicas, ni alteraciones en el aspecto ecográfico del parénquima testicular.

En cada animal se realizaron cinco ensayos. En todos ellos se hacían exámenes ecográficos mediante Doppler pulsado de las arterias testiculares, no encontrándose diferencias significativas en los parámetros estudiados entre ambos testículos de cada perro.

La arteria supratesticular se visualizó en toda su longitud, siendo su aspecto tortuoso. La arteria marginal se observó a lo largo del borde marginal del testículo, tanto en el plano longitudinal como en el transversal. Y las arterias intratesticulares tenían un recorrido recto dentro del parénquima testicular, apreciándose mejor en los planos oblicuos. La dirección del flujo, según el plano tomado, se acercaba o se alejaba del transductor en todas las arterias en estudio.

Las arterias evaluadas (supratesticular, marginal e intratesticulares) presentaron un modelo de flujo de baja resistencia con un patrón monofásico, caracterizado por un único pico sistólico y una diástole elevada (Fig. 16).

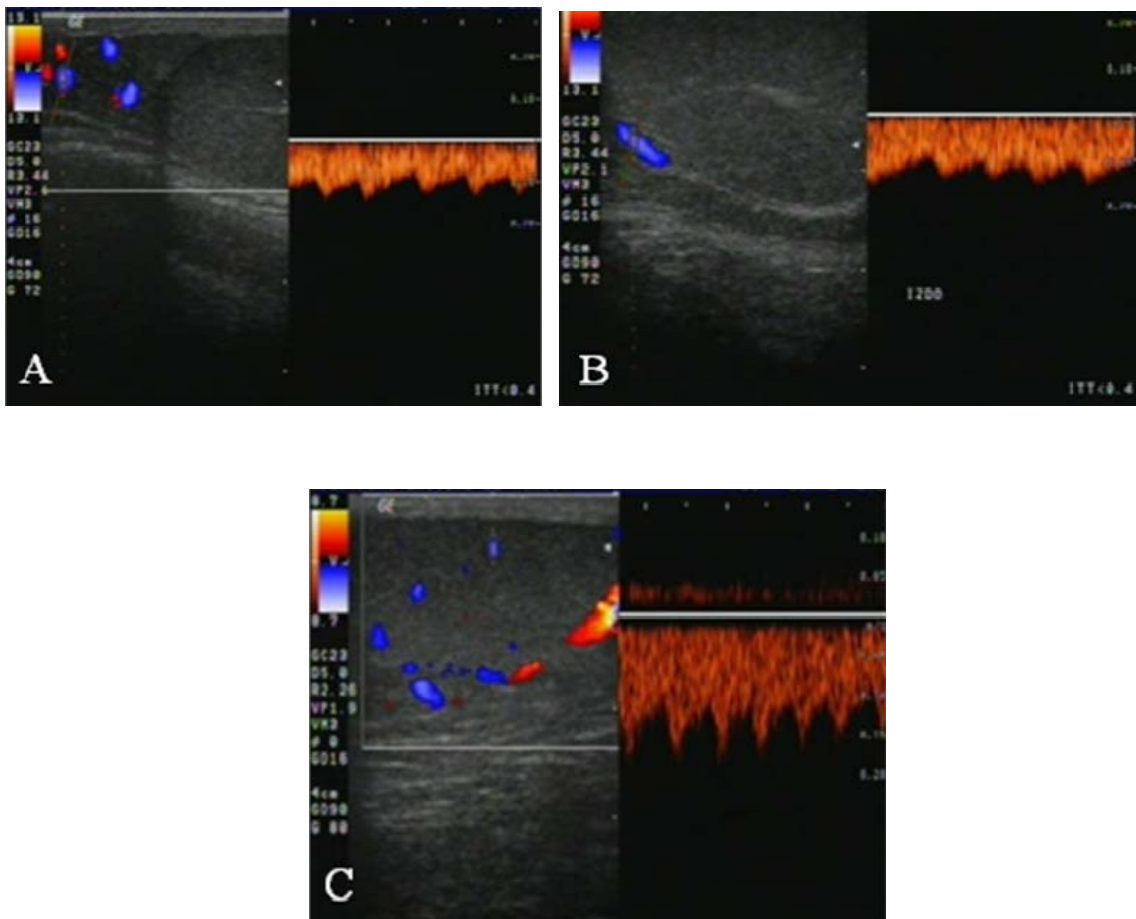


Figura 16. Imagen Duplex Doppler de (A) la arteria supratesticular, (B) la arteria marginal y (C) las arterias intratesticulares. Se observa en la onda espectral un único pico sistólico con una diástole elevada.

Las arterias testiculares de los cinco perros en estudio se comportaron de manera similar a lo largo de la experiencia, no observándose diferencias significativas entre los valores obtenidos en los parámetros de vascularización evaluados entre cada uno de los animales, por lo que para el estudio estadístico se les consideró como un solo animal.

Los valores de VPS, VFD, IR e IP obtenidos con el Doppler pulsado para las diferentes arterias se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Resultados de los valores (media \pm error típico) de VPS, VFD, IR e IP de las arterias testiculares.

ARTERIA	VPS (cm/s)	VFD (cm/s)	IR	IP
Suprtesticular	15.32 \pm 5.28 ^a	6.76 \pm 1.88 ^a	0.53 \pm 0.13 ^a	0.88 \pm 0.39 ^a
Marginal	10.72 \pm 3.86 ^b	6.24 \pm 2.19 ^b	0.41 \pm 0.10 ^b	0.63 \pm 0.20 ^b
Intratesticulares	6.34 \pm 1.51 ^c	4.10 \pm 0.86 ^c	0.35 \pm 0.07 ^c	0.49 \pm 0.12 ^c

Diferentes letras de superíndices en la misma columna indican que hay diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

VPS= Velocidad del Pico Sistólico; VFD= Velocidad al Final de la Diástole; IR= Índice de Resistividad; IP= Índice de Pulsatilidad.

Los valores obtenidos en todos los parámetros estudiados (VPS, VFD, IR e IP) en las diferentes arterias (suprtesticular, marginal e intratesticulares) se comportaron de manera idéntica.

Los valores más altos aparecieron en la arteria supratesticular y disminuían gradualmente, encontrando los valores más bajos en las arterias intratesticulares.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en todos los valores obtenidos (VPS, VFD, IR e IP) entre las diferentes arterias.

5.2. Experiencia 2: Establecer la correlación entre los valores del IR de las arterias testiculares con los parámetros de concentración y motilidad espermática en el perro.

Los valores del IR en las arterias supratesticular, marginal e intratesticulares durante toda la experiencia 2 (Tabla 7) fueron similares a los obtenidos en la experiencia 1 (Tabla 6), no observándose diferencias significativas entre los perros en estudio.

Los mayores valores se encontraron en la arteria supratesticular, descendiendo paulatinamente en la arteria marginal y viéndose el menor valor en las arterias intratesticulares.

Todos los valores obtenidos, tanto de los parámetros vasculares como de calidad y motilidad espermática fueron evaluados mediante el test de Friedman, observándose que se mantenían constantes entre los perros en estudio a lo largo de los 15 ensayos, por lo que para el estudio de las correlaciones mediante el coeficiente de Spearman se

consideraron los cinco perros como uno sólo, expresando los resultados en conjunto.

Tabla 7. Resultados de los valores del IR (media \pm error típico) en las arterias testiculares de los cinco perros en estudio a lo largo de los 15 ensayos.

ARTERIA	IR
Supratesticular	0.46 \pm 0.15 ^a
Marginal	0.37 \pm 0.07 ^b
Intratesticulares	0.33 \pm 0.04 ^c

Diferentes letras de superíndices indican que hay diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). IR= Índice de Resistividad.

Los valores de motilidad y calidad espermática en el semen fresco de los cinco perros a lo largo de los quince ensayos que duró la experiencia quedan reflejados en las Tablas 8 y 9.

Los resultados se encontraban dentro de los valores normales dados por el sistema de análisis computerizado ISAS[®] CASMA.

Tabla 8. Resultados de los valores (media \pm error típico) del análisis de motilidad espermática en semen fresco de los perros en estudio, a lo largo de los 15 ensayos.

PARÁMETROS	PERRO 1 (n=15)	PERRO 2 (n=15)	PERRO 3 (n=15)	PERRO 4 (n=15)	PERRO 5 (n=15)
Motilidad total (%)	83.40 \pm 7.72	96.53 \pm 1.60	95.33 \pm 3.35	95.20 \pm 3.57	70.13 \pm 8.12
Motilidad progresiva (%)	53.29 \pm 9.96	69.55 \pm 14.91	61.56 \pm 17.68	53.46 \pm 17.27	59.46 \pm 14.95
VCL ($\mu\text{m/s}$)	81.01 \pm 9.10	87.16 \pm 8.06	82.09 \pm 13.01	83.41 \pm 12.80	83.42 \pm 10.74
VSL ($\mu\text{m/s}$)	54.39 \pm 9.37	55.36 \pm 12.97	49.91 \pm 13.90	48.05 \pm 14.40	51.93 \pm 12.66
VAP ($\mu\text{m/s}$)	61.66 \pm 9.88	62.28 \pm 12.31	57.41 \pm 12.83	57.07 \pm 14.38	57.47 \pm 14.88
LIN (%)	66.89 \pm 7.78	62.85 \pm 11.52	59.47 \pm 10.30	56.63 \pm 11.06	61.46 \pm 10.16
STR (%)	88.02 \pm 2.25	88.04 \pm 5.76	85.22 \pm 8.48	83.07 \pm 5.55	86.08 \pm 5.51
WOB (%)	75.87 \pm 7.36	70.89 \pm 9.75	69.21 \pm 7.08	67.72 \pm 9.97	70.92 \pm 8.54
ALH (μm)	2.82 \pm 0.36	3.05 \pm 0.48	3.06 \pm 0.34	3.32 \pm 0.49	2.31 \pm 0.42
BCF (Hz)	12.63 \pm 0.57	12.75 \pm 1.28	12.21 \pm 1.07	11.59 \pm 1.49	12.29 \pm 1.10

n= número de eyaculados

VCL= Velocidad curvilínea; VSL= Velocidad rectilínea; VAP= Velocidad media; LIN= Linealidad; STR= Rectitud; WOB= Oscilación; ALH= Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza espermática; BCF= Frecuencia del desplazamiento de la cabeza espermática o de batido.

Tabla 9. Resultados de los valores (media \pm error típico) del análisis de calidad espermática en el semen fresco de los perros en estudio, a lo largo de los 15 ensayos.

PARÁMETROS	PERRO 1 (n=15)	PERRO 2 (n=15)	PERRO 3 (n=15)	PERRO 4 (n=15)	PERRO 5 (n=15)
Color	Blanco opalescente	Blanco opalescente	Blanco opalescente	Blanco opalescente	Blanco opalescente
Volumen (ml)	1.16 \pm 0.34	2.50 \pm 0.08	1.97 \pm 0.80	1.91 \pm 0.38	1.99 \pm 0.80
Concentración ($\times 10^6$ / ml)	756.27 \pm 403.64	373.1 \pm 219.78	331.13 \pm 137.11	1080.90 \pm 550.29	635.35 \pm 327.70
Espermatozoides vivos (%)	83.33 \pm 4.75	95.67 \pm 2.13	89.27 \pm 6.49	86.73 \pm 24.14	88.75 \pm 9.37
Morfología anormal (%)	21.20 \pm 10.63	3.33 \pm 2.50	5.53 \pm 3.14	4.47 \pm 2.88	8.62 \pm 4.78

n= número de eyaculados.

Los resultados de la correlación entre los valores del IR con los valores obtenidos en la contrastación espermática el mismo día de

ensayo (Tiempo *a*) y tras un ciclo de espermatogénesis (Tiempo *b*) en cada una de las arterias evaluadas quedan reflejados en las Tablas 10, 11 y 12.

En cada una de las arterias en estudio y en todos los casos en los que se obtuvo una correlación, tanto positiva como negativa, con alguno de los parámetros espermáticos evaluados, dicha correlación se evidenció débil y presente tanto a Tiempo *a* como a Tiempo *b*.

Con respecto a la arteria supratesticular, únicamente se observó una correlación estadísticamente significativa positiva del IR con los valores de motilidad espermática de VSL, LIN, STR, WOB y BCF (Tabla 10). En el resto de los parámetros estudiados no se observó ninguna correlación.

En la arteria marginal, únicamente se evidenció una correlación estadísticamente significativa positiva del IR con el valor parámetro STR (Tabla 11). En el resto de los parámetros no hubo ninguna correlación.

Por último, con respecto a los resultados de las arterias intratesticulares, se apreció una correlación estadísticamente significativa negativa del IR con la concentración espermática y una correlación positiva del IR con la motilidad progresiva, VSL, VAP, LIN, STR y BCF (Tabla 12).

Tabla 10. Resultados de los valores del coeficiente de Spearman de la correlación del IR de la arteria supratesticular con respecto a los valores de contrastación seminal en Tiempo *a* y *b*, a lo largo de los 15 ensayos.

PARÁMETROS	Tiempo <i>a</i>	Tiempo <i>b</i>
Volumen (ml)	0.125	0.006
Concentración (x 10 ⁶ / ml)	0.012	0.016
Espermatozoides vivos (%)	0.210	0.111
Morfología anormal (%)	0.045	0.167
Mortalidad total (%)	0.004	-0.097
Motilidad progresiva (%)	0.247	0.170
VCL (µm/s)	0.158	0.085
VSL (µm/s)	0.327 ^(*)	0.281 ^(*)
VAP (µm/s)	0.295	0.244
LIN (%)	0.318 ^(*)	0.301 ^(*)
STR (%)	0.368 ^(**)	0.358 ^(*)
WOB (%)	0.287 ^(*)	0.268 ^(*)
ALH (µm)	-0.206	-0.212
BCF (Hz)	0.391 ^(**)	0.374 ^(**)

(*) Indican que hay diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$)

(**) Indican que hay diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$)

VCL= Velocidad curvilínea; VSL= Velocidad rectilínea; VAP= Velocidad media; LIN= Linealidad; STR= Rectitud; WOB= Oscilación; ALH= Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza espermática; BCF= Frecuencia del desplazamiento de la cabeza espermática o de batido.

Tabla 11. Resultados de los valores del coeficiente de Spearman de la correlación del IR de la arteria marginal con respecto a los valores de contrastación seminal en Tiempo *a* y *b* a lo largo de los 15 ensayos.

PARÁMETROS	Tiempo <i>a</i>	Tiempo <i>b</i>
Volumen (ml)	0.004	-0.056
Concentración (x 10 ⁶ / ml)	-0.084	0.110
Espermatozoides vivos (%)	0.295	0.156
Morfología anormal (%)	-0.071	0.014
Motilidad total (%)	0.093	-0.023
Motilidad progresiva (%)	0.354	0.226
VCL (µm/s)	0.224	0.075
VSL (µm/s)	0.324	0.196
VAP (µm/s)	0.287	0.154
LIN (%)	0.274	0.200
STR (%)	0.400(*)	0.342(*)
WOB (%)	0.216	0.138
ALH (µm)	-0.098	-0.088
BCF (Hz)	0.173	0.192

(*) Indican que hay diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$)
 VCL= Velocidad curvilínea; VSL= Velocidad rectilínea; VAP= Velocidad media; LIN= Linealidad; STR= Rectitud; WOB= Oscilación; ALH= Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza espermática; BCF= Frecuencia del desplazamiento de la cabeza espermática o de batido.

Tabla 12. Resultados de los valores del coeficiente de Spearman de la correlación del IR de las arterias intratesticulares con respecto a los valores de contrastación seminal en Tiempo *a* y *b*, a lo largo de los 15 meses.

PARÁMETROS	Tiempo <i>a</i>	Tiempo <i>b</i>
Volumen (ml)	0.198	0.177
Concentración (x 10 ⁶ / ml)	-0.254(*)	-0.327(*)
Espermatozoides vivos (%)	0.346	0.242
Morfología anormal (%)	-0.074	-0.099
Motilidad total (%)	0.183	0.093
Motilidad progresiva (%)	0.464(**)	0.396(**)
VCL (µm/s)	0.318	0.192
VSL (µm/s)	0.391(**)	0.313(*)
VAP (µm/s)	0.354(**)	0.255(*)
LIN (%)	0.305(*)	0.276(*)
STR (%)	0.483(**)	0.497(**)
WOB (%)	0.221	0.176
ALH (µm)	-0.141	-0.105
BCF (Hz)	0.311(*)	0.308(*)

(*) Indican que hay diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$)

(**) Indican que hay diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$)

VCL= Velocidad curvilínea; VSL= Velocidad rectilínea; VAP= Velocidad media; LIN= Linealidad; STR= Rectitud; WOB= Oscilación; ALH= Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza espermática; BCF= Frecuencia del desplazamiento de la cabeza espermática o de batido.

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

La ecografía Doppler color es en la actualidad el método de elección para evaluar la vascularización de la mayoría de los órganos, incluyendo los testículos (Pozor y McDonnell, 2004).

Tanto en humana como en veterinaria se ha estudiado el uso del Doppler color en la evaluación de las anomalías que afectan al flujo sanguíneo testicular, como son la torsión testicular, orquitis y epididimitis (Middlenton y cols., 1989; Tarhan y cols., 2000; Ober y cols., 2004).

En el hombre, se describe que las arterias testiculares son estructuras diana para los andrógenos (Hsu y cols., 1993). Por otra parte, el Doppler color junto con el Doppler potenciado (Power Doppler) y pulsado son eficaces para evaluar la perfusión testicular (Schurich y cols., 2009).

En humana, el Doppler color y pulsado representan una técnica prometedora para la evaluación de pacientes afectados por azoospermia, ya que permiten discriminar la azoospermia obstructiva (que presenta un flujo sanguíneo normal) de la no obstructiva (con una ausencia o disminución del flujo vascular) (Schurich y cols., 2009). Y se

utilizan de manera rutinaria para examinar el flujo sanguíneo de la arteria testicular en el diagnóstico de patologías testiculares (Aydos y cols., 1993; Sriprasad y cols., 2001), como método predictor de la espermatogénesis (Biagotti y cols., 2002; Pinggera y cols., 2008) y como técnica para guiar la punción de extracción de espermatozoides a nivel testicular (Eytan y cols., 2001).

Sin embargo, en el conocimiento de los autores, existen pocas publicaciones del uso del Doppler color y pulsado en el estudio del flujo sanguíneo testicular en la especie canina (Günzel-Apel y cols., 2001; Gumbsch y cols., 2002; Bright y England, 2011; Zelli y cols., 2013a; Souza y cols., 2014).

Por ello, los objetivos que se plantearon en este estudio fueron por una parte realizar una primera experiencia para obtener los valores de referencia de la VPS, VFD, IR e IP de las arterias testiculares (arteria supratesticular, marginal e intratesticulares) en el perro. Y en una segunda experiencia, determinar si existía correlación entre los valores del IR de las arterias testiculares con los parámetros seminales (concentración y motilidad) de los espermatozoides no conservados, en dos tiempos de evaluación: durante el mismo día de la evaluación ecográfica (Tiempo *a*) y tras un ciclo de espermatogénesis (aproximadamente 62 días) (Tiempo *b*).

6.1. Experiencia 1: Describir la morfología de la onda espectral y establecer los valores de VPS, VFD, IR e IP de las arterias testiculares en el perro.

En esta primera experiencia se realizaron cinco ensayos en cada uno de los animales, haciéndose un examen ecográfico de los testículos una vez a la semana.

Las arterias estudiadas (suprtesticular, marginal e intratesticulares) fueron fácilmente identificadas con el Doppler color.

El flujo de la arteria suprtesticular fue medido en la zona más próxima al testículo, y tanto la dirección de su flujo como su trayectoria no pudieron ser visualizados correctamente debido a su curso cambiante, coincidiendo con lo descrito por Middlenton y cols. (1989) en pacientes humanos, y por Gumbsch y cols. (2002) y Souza y cols. (2014) en el perro.

Por otro lado, el flujo en la arteria marginal fue el que mejor se detectó (Gumbsch y cols., 2002; Souza y cols., 2014), visualizándose su recorrido recto desde el polo craneal al caudal del testículo (Günzel-Apel y cols., 2001).

Con respecto a las arterias intratesticulares, en nuestra experiencia, se visualizaron en todos los exámenes ecográficos realizados, observándose como píxeles de color de diferentes tamaños. Y la medición de su flujo se obtuvo fácilmente en los cinco perros estudiados, en todos los ensayos. Nuestros resultados difieren por tanto

de lo descrito por los diferentes autores, tanto en el perro (Günzel-Apel y cols., 2001; Gumbsch y cols., 2002) como en el hombre (Ünsal y cols., 2007), que definen estas arterias como vasos no adecuados para la medición del flujo sanguíneo mediante el Doppler pulsado al ser tortuosos, pequeños y con flujo lento, lo que según dichos autores dificulta su evaluación. Esta diferencia con nuestros resultados puede ser debida al empleo en la actualidad de transductores con mayor resolución, lo que nos aporta una mayor facilidad para detectar vasos de calibre tan pequeño.

El modelo de flujo sanguíneo observado en nuestro estudio fue de baja resistencia para las arterias supratesticular y marginal, coincidiendo con lo descrito en la literatura para la especie canina (Günzel-Apel y cols., 2001; Gumbsch y cols., 2002; Souza y cols., 2014). En las arterias intratesticulares se encontró el mismo modelo de baja resistencia de acuerdo con los estudios de Gumbsch y cols. (2002) en el perro. En el hombre se describe este mismo tipo de flujo sanguíneo en las arterias testiculares, y además en la arteria supratesticular se describe una zona de alta resistencia vascular cuando se mide en su porción más craneal y distal al testículo. Esta diferencia en la resistencia del flujo sanguíneo es debida a que en el área del cordón espermático, en la zona más distal al testículo, junto con la arteria supratesticular se encuentran la arteria deferencial y la arteria cremastérica (Middlenton y cols., 1989).

En nuestro estudio los valores de las velocidades del flujo sanguíneo (VPS y VFD) presentaban diferencias estadísticamente significativas entre las arterias evaluadas con un patrón decreciente,

observándose los valores más altos en la arteria supratesticular, seguidos por los valores de la arteria marginal y encontrando los valores más bajos en las arterias intratesticulares. Esto coincide con lo obtenido para la VPS en los estudios de Middlenton y cols. (1989) en el hombre; sin embargo, no concuerdan con los valores encontrados en el perro por Günzel-Apel y cols. (2001) donde los mayores valores se hallaron en la arteria marginal, ni con Souza y cols. (2014) que no vieron diferencias significativas de la VPS entre la arteria marginal y la supratesticular.

En cuanto a los valores de la VFD, nuestros resultados difieren con lo descrito por otros autores tanto en humana (Middlenton y cols., 1989) como en veterinaria (Günzel-Apel y cols., 2001), que describen valores de VFD mayores en la arteria marginal que en la arteria supratesticular.

Uno de los motivos que puede explicar la diferencia entre los resultados en la VPS y la VFD de nuestra experiencia con los descritos por la bibliografía, es la obtención de valores inferiores a los reales en estas velocidades para la arteria supratesticular, debido a la dificultad de conseguir un buen trayecto de dicha arteria, y con ello un buen ángulo Doppler, a causa de la dirección cambiante de su flujo sanguíneo dentro del cordón espermático (Gumbsch y cols., 2002). A diferencia de la arteria marginal que es perfectamente detectada en toda su trayectoria (Günzel-Apel y cols., 2001; Gumbsch y cols., 2002; Souza y cols., 2014).

Con respecto a los resultados obtenidos del IR e IP en la presente experiencia obtuvimos diferencias estadísticamente significativas entre las tres arterias, tal y como ocurría con las velocidades (VPS e VFD), encontrándose los valores más altos en la arteria supratesticular, lo que coincide con lo publicado tanto en medicina humana (Middlenton y cols., 1989) como en veterinaria (Günzel-Apel y cols., 2001; Gumbsch y cols., 2002; Pozor y McDonell, 2004; Souza y cols., 2014). Los valores más bajos fueron detectados en las arterias intratesticulares como también describe Gumbsch y cols. (2002). Esta disminución gradual estadísticamente significativa del valor del IR e IP entre las arterias puede ser debido a que estos índices se calculan a partir de las velocidades del flujo sanguíneo (VFD y VPS), las cuales según lo observado en este estudio, disminuyen gradualmente de forma estadísticamente positiva en función del calibre del vaso estudiado.

Los valores medios de VPS, VFD, IR e IP en la arteria supratesticular y marginal obtenidos en el presente trabajo son, en general, similares a los obtenidos en el perro por Souza y cols. (2014) (Tabla 1). Sin embargo nuestros valores medios de VPS y VFD en estas arterias fueron diferentes a los descritos por Gumbsch y cols. (2002). Esto puede ser debido a lo anteriormente comentado sobre la variabilidad en el valor de las velocidades en la arteria supratesticular por sus características anatómicas y al hecho de que estos autores (Gumbsch y cols., 2002) únicamente realizaron un único estudio ecográfico Doppler por animal. Ni Günzel-Apel y cols. (2001) ni Souza y cols. (2014) estudiaron las arterias intratesticulares. Por su parte, Gumbsch y cols. (2002) obtuvieron valores medios del IR e IP en las arterias intratesticulares mayores a los de nuestra experiencia. Esta

diferencia podría deberse a que estos índices son obtenidos a partir de la VPS y la VFD, y estas velocidades en el estudio de Gumbsch y cols. (2002) presentaban valores medios también mayores a los obtenidos en nuestra experiencia.

Como mencionamos previamente, en nuestro trabajo obtuvimos los valores medios de la VPS, VFD, IR e IP de las tres arterias testiculares a lo largo de varios ensayos, confirmando estadísticamente que estos valores se mantenían constantes a lo largo del tiempo y entre los perros en estudio. Además se demostró la existencia de diferencias estadísticamente significativas de estos valores entre la arteria supratesticular, marginal e intratesticulares. Por todo ello, nuestro estudio, aporta con mayor solidez unos valores de referencia de estos parámetros cuantitativos y semicuantitativos de las arterias testiculares (arteria supratesticular, marginal e intratesticulares) en el perro con respecto a lo descrito hasta la actualidad por la literatura veterinaria.

6.2. Experiencia 2: Establecer la correlación entre los valores del IR de las arterias testiculares con los parámetros de concentración y motilidad espermática en el perro.

La espermatogénesis es un proceso que se realiza en los testículos y culmina con la producción de varios millones de espermatozoides diarios (Bergh y cols., 2001).

El testículo está irrigado por la arteria testicular, que proviene de la aorta y es un vaso muy largo con un flujo de alta resistencia en su porción más craneal. Los testículos tienen una presión arterial en los capilares intratesticulares inferior a la que presenta cualquier otro órgano, y sólo ligeramente mayor a la de la presión venosa intratesticular. Dicha presión sin embargo, es suficiente para asegurar los altos requerimientos metabólicos de los túbulos seminíferos a pesar de estar expuestos a estas particulares condiciones de baja presión y baja tensión de oxígeno (Bergh y cols., 2001). Por ello, los túbulos seminíferos son particularmente susceptibles a cualquier alteración en el sistema vascular (Damber y Bergh, 1992; Bergh y Damber, 1993) y una restricción parcial en el flujo de la arteria testicular puede afectar al volumen, crecimiento y estructura histológica del testículo, pudiendo causar la parada completa o parcial del proceso de espermatogénesis (Kay y cols., 1992).

En medicina humana y veterinaria los métodos más utilizados para la valoración de la función reproductiva en el macho son la ecografía y el estudio de los parámetros del semen fresco (Zelli y cols., 2013b).

El estudio de la vascularización de los testículos y su utilidad para valorar la espermatogénesis o el diagnóstico de subfertilidad en el hombre ha sido ampliamente revisado. Se ha demostrado que en pacientes con azoospermia, la cantidad y calidad espermática depende de la perfusión tisular (Herwig y cols., 2007), así como que el estudio con Doppler color y pulsado de las arterias testiculares en el hombre podría ser un indicador de la espermatogénesis (Biagiotti y cols., 2002). En concreto, el estudio del IR en estas arterias es el parámetro más

utilizado hoy día para la evaluación del flujo sanguíneo intratesticular (Pinggera y cols., 2008; Schurich y cols., 2009; Al-Naffakh, 2012), valorar la integridad testicular (Pinggera y cols., 2008) así como las patologías escrotales (Jee y cols., 1997).

En la literatura de medicina veterinaria de pequeños animales existen pocas publicaciones sobre la utilidad del estudio de la vascularización de los testículos y su uso como predictor de la espermatogénesis. Se ha descrito que el flujo sanguíneo de los testículos del perro es reflejado principalmente por el IR (Tarhan y cols., 2000; Gumbsch y cols., 2002) y el IP (Gumbsch y cols., 2002), así como que estos mismos índices podrían ser marcadores potenciales de la calidad seminal en el perro (Zelli y cols., 2013b). También se ha visto que los cambios observados en la ecogenicidad y homogeneidad del parénquima testicular del perro, podrían ser una información útil en la detección de anomalías en la calidad seminal (Bright y England, 2011).

En nuestro estudio se utilizaron cinco perros de raza Beagle, en los que durante un período de 15 semanas consecutivas, se les realizó semanalmente un examen ecográfico Doppler color y pulsado de las arterias testiculares e inmediatamente después una extracción y contrastación seminal. Se obtuvieron un total de 15 ensayos durante los cuales, los perros mantuvieron los parámetros de calidad y motilidad seminal homogéneos, constantes y dentro de los rangos de referencia descritos en la bibliografía (Peña, 1997; Johnston y cols., 2001; Schäfer-Somi y Aurich, 2007). Por otro lado, los valores del IR de las arterias testiculares (Tabla 7) se encontraron dentro de los rangos de referencia observados en nuestra primera experiencia (Tabla 6).

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren la existencia de una relación estadísticamente significativa, aunque débil, entre el IR de las tres arterias testiculares analizadas (suprtesticular, marginal e intratesticulares) y algunos de los parámetros que definen la concentración y motilidad seminal. Para las tres arterias testiculares esta relación estadística se evidenció tanto durante un mismo ensayo (Tiempo *a*) como tras un ciclo de espermatogénesis (aproximadamente 62 días) (Tiempo *b*).

En relación al estudio de la arteria suprtesticular, el IR presentó correlaciones estadísticamente significativas positivas con los valores de motilidad seminal: VSL, LIN, STR, WOB y BCF. Nuestros resultados difieren de los observados por Zelli y cols. (2013b), que según la bibliografía consultada por los autores es el único estudio existente que relaciona el IR de la arteria suprtesticular con la calidad seminal en el semen fresco del perro. En dicho estudio se observó una correlación significativa negativa de este índice con la motilidad total y progresiva de los espermatozoides, describiéndose que esta relación inversa entre el IR y la perfusión sanguínea en el testículo se traducían en una mayor eficiencia de la espermatogénesis desde un punto de vista cuantitativo. En nuestra experiencia no se ha observado ninguna correlación de este índice con los parámetros de motilidad total y progresiva a Tiempo *a*, lo cual podría deberse al método empleado en la valoración de la motilidad espermática. Mientras que Zelli y cols. (2013b) analizan los parámetros de motilidad espermática mediante su visualización directa en microscopio, en nuestro estudio la evaluación de la motilidad seminal se hizo utilizando un sistema de análisis computerizado (sistema CASA).

En la actualidad está reconocido que la visualización directa de las muestras espermáticas es un método de análisis subjetivo y muy variable en función del operario que realiza el estudio, por lo cual se recomienda el empleo de técnicas de análisis más precisas, que permiten la obtención de datos de forma rápida y objetiva (Schäfer-Somi y Aurich, 2007; Rijsselaere y cols., 2012), como es el sistema CASA.

Por otra parte, a pesar de que encontramos una correlación del IR con algunos de los parámetros que determinan la calidad del movimiento espermático, dicha correlación fue muy débil y positiva, no viéndose afectados los valores globales de motilidad total y progresiva. Hay que tener en cuenta la complejidad anatómica de la arteria supratesticular y que las medidas obtenidas pueden variar o incluso ser erróneas en función de la zona en la que se tome la medición. Esto puede conllevar que la arteria supratesticular no refleje el estado hemodinámico verdadero de la microcirculación testicular (Ünsal y cols., 2007), por lo que el uso del valor del IR en esta arteria podría ser desestimado o puesto en duda. Por ello, serían necesarios futuros estudios con un mayor número de animales, para poder conocer la verdadera utilidad de este parámetro en esta arteria, con relación a la concentración y motilidad espermática en el perro.

Con respecto a la arteria marginal, únicamente encontramos una correlación positiva débil de los valores del IR con el parámetro de motilidad espermática STR, tanto en el día de la medición (Tiempo *a*) como con respecto a la evaluación seminal realizada tras un ciclo de espermatogénesis (aproximadamente 62 días) (Tiempo *b*). Dicho

parámetro indica la rectitud en el movimiento de los espermatozoides obteniéndose su valor gracias al coeficiente del dividendo de la velocidad media (VAP) entre la velocidad curvilínea (VCL), parámetros que en cambio no se observaron correlacionados en nuestros resultados.

Todo ello puede sugerir la escasa validez de la evaluación del IR en la arteria marginal como posible predictor de la espermatogénesis, frente a lo descrito por Ünsal y cols. (2007) en medicina humana, que hacen referencia a valores significativamente más altos del IR en pacientes con varicocele respecto al grupo control, sugiriendo que la medición de este valor en la arteria marginal puede ser un parámetro fiable para detectar alteraciones en la condición hemodinámica testicular. Así mismo, describen el valor del IR como un parámetro fiable para evaluar la resistencia al flujo en el sistema arterial y para detectar alteraciones en la microcirculación testicular que afectan directamente a la producción y calidad espermática. En nuestro estudio únicamente fueron utilizados animales sanos, siendo necesarios futuros estudios en perros con patologías vasculares testiculares para poder contrastar los resultados con los obtenidos en humana.

Como ya se describió en la primera experiencia, nuestros resultados indican que las arterias intratesticulares son vasos adecuados para la medición de flujo sanguíneo mediante el Doppler pulsado, a diferencia de lo descrito por la bibliografía tanto en el perro (Günzel-Apel y cols., 2001; Gumbsch y cols., 2002) como en el hombre (Ünsal y cols., 2007).

Otros autores afirman que la medición del IR en las arterias intratesticulares en el hombre puede ser un indicador fiable de la calidad espermática (Pinggera y cols., 2008; Al-Naffakh, 2012).

En nuestro conocimiento, este es el primer estudio que analiza la relación entre el IR de las arterias intratesticulares y los parámetros de calidad seminal en la especie canina. Nuestros resultados muestran correlaciones estadísticamente significativas débiles entre el IR de las arterias intratesticulares y la concentración espermática, motilidad progresiva y los parámetros de motilidad espermática: VSL, LIN, STR, BCF y VAP en ambos tiempos de evaluación, es decir, que estas correlaciones se mantuvieron constantes durante todo el ciclo de espermatogénesis. Al ser en estas arterias donde se observa un mayor número de correlaciones, se podría especular que el estudio del IR en estas arterias podría ser considerado un posible predictor de la calidad seminal en el perro, dado que son las arterias terminales de la arteria testicular y serían las primeras en las que se podrían detectar las alteraciones que dañen o alteren el proceso de espermatogénesis.

Por otra parte, las correlaciones significativas del IR de las arterias intratesticulares con la motilidad progresiva y los parámetros de motilidad espermática analizados mediante el sistema informático objetivo CASA fueron positivas, no existiendo en la actualidad en el conocimiento de los autores, estudios realizados y publicados que puedan justificar este hecho.

Respecto a la correlación observada entre el IR y la concentración espermática, fue la única de todo el estudio que resultó

significativamente negativa. Esta correlación negativa indicaría que cuanto más bajo es el valor del IR, y por tanto hay una mejor perfusión del parénquima testicular, mayores son los valores de concentración espermática, lo que significa que una mejor calidad seminal es esperable desde un punto de vista cuantitativo.

En medicina humana, en pacientes azoospermicos, se ha demostrado que la cantidad espermática depende de la perfusión tisular (Herwig y cols., 2007). En el testículo como ya se ha comentado anteriormente, la presión capilar y la tensión de oxígeno son bajos y la espermatogénesis está adaptada a este entorno que evita el daño de los radicales del oxígeno sobre los espermatozoides (Setchell y cols., 1994). También se ha descrito que en las primeras etapas de la espermatogénesis las células son más sensibles a la reducción del flujo sanguíneo arterial (Nolte y cols. 1995) y esta disminución en el flujo de sangre puede conllevar una disminución en la concentración y cambios en los nucleótidos de adenina, resultando en una alteración de la espermatogénesis secundaria a defectos en el metabolismo energético a nivel mitocondrial (Hsu y cols., 1994).

Sin embargo, la correlación observada aunque negativa, fue significativamente débil al igual que lo observado en el resto de arterias analizadas. Este hecho podría quizás ser debido al bajo número de perros empleados en nuestro estudio y a la uniformidad de los datos obtenidos a lo largo del tiempo.

En nuestra opinión y en base a nuestros resultados, consideramos que el valor del IR en las arterias intratesticulares podría ser un

parámetro predictor de la espermatogénesis a nivel cuantitativo, pero no tanto a nivel cualitativo, ya que como hemos visto muestran sólo una correlación positiva con la motilidad progresiva y no con la motilidad total. La motilidad espermática puede estar influenciada por numerosos factores. Así, a pesar de que en nuestro estudio los valores de contrastación seminal no sufrieron variaciones a lo largo del tiempo de estudio, recientemente se ha sugerido la existencia de una influencia estacional sobre la calidad seminal del perro (Albrizio y cols., 2013). Aunque el perro se considera una especie no estacional, en dicho estudio se observa una correlación significativa negativa entre la concentración de testosterona a nivel seminal y los porcentajes de motilidad total de los espermatozoides, pese a que los valores de testosterona en suero se mantuvieron constantes a lo largo del año. Esto se traducía en un incremento de la motilidad total significativa cuando los valores de testosterona seminal disminuían significativamente en el eyaculado en los meses de marzo y abril. Los resultados de dicho estudio sugieren que las condiciones medioambientales podían afectar a los parámetros de motilidad del macho. Esta influencia estacional sobre la motilidad quizás puede influir en las correlaciones débiles positivas encontradas en los IR de las distintas arterias con los parámetros de motilidad en nuestro estudio.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos y en las condiciones de nuestra experiencia, podemos deducir las siguientes conclusiones:

1. Las arterias suprategesticular, marginal e intrategesticulares presentaron un modelo de onda espectral de baja resistencia.
2. Los valores de VFD, VPS, IR e IP de las arterias suprategesticular, marginal e intrategesticulares presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ellas, existiendo una disminución gradual de su valor, encontrándose el mayor valor en la arteria suprategesticular y el menor en las arterias intrategesticulares.
3. Los valores medios de referencia de la VPS, VFD, IR e IP obtenidos fueron:
 - arteria suprategesticular: $15.32 \text{ cm/s} \pm 5.28$; $6.76 \text{ cm/s} \pm 1.88$; 0.53 ± 0.13 y 0.88 ± 0.39 , respectivamente;
 - arteria marginal: $10.72 \text{ cm/s} \pm 3.86$; $6.24 \text{ cm/s} \pm 2.19$; 0.41 ± 0.10 y 0.63 ± 0.20 , respectivamente;

- arterias intratesticulares: $6.34 \text{ cm/s} \pm 1.51$; $4.10 \text{ cm/s} \pm 0.86$; 0.35 ± 0.07 y 0.49 ± 0.12 , respectivamente.
4. En todas las arterias testiculares las correlaciones estadísticamente significativas de los valores del IR con los parámetros seminales analizados estuvieron presentes tanto en el momento del examen (Tiempo *a*) como tras un ciclo de espermatogénesis (Tiempo *b*).
 5. Se obtuvieron correlaciones significativas positivas débiles muy variables entre los valores del IR y los parámetros de la motilidad espermática en todas las arterias testiculares analizadas. En la arteria supratesticular, la correlación fue observada con los parámetros VSL, LIN, STR, WOB y BCF. En la arteria marginal, únicamente con STR. Mientras que, en las arterias intratesticulares, fueron con los parámetros de motilidad progresiva, VSL, VAP, LIN, STR, BCF.
 6. Únicamente se observó una correlación significativa negativa entre los valores del IR con la concentración espermática en las arterias intratesticulares. Por tanto, los valores del IR en estas arterias podrían ser considerados como un parámetro predictor de la calidad seminal a nivel cuantitativo.

RESUMEN

9. RESUMEN

La ecografía, tanto el modo B como el Doppler, se utiliza frecuentemente en el diagnóstico de patologías y alteraciones del aparato reproductor del perro. El Doppler pulsado se ha empleado para describir las características de la onda espectral de la arteria testicular, así como establecer sus valores de referencia de los parámetros cuantitativos (velocidad del pico sistólico, VPS; velocidad al final de la diástole, VFD) y semicuantitativos (índice de resistividad, IR; índice de pulsatilidad, IP) tanto en el hombre, como en el caballo y el perro. Se ha descrito que el valor del IR de las arterias testiculares en el hombre podría ser un indicador de la espermatogénesis, y en el perro un marcador de la calidad seminal. Sin embargo, existe poca información sobre las características y parámetros cuantitativos y semicuantitativos de las arterias testiculares en el perro y sobre su aplicación como predictores de la calidad espermática.

El objetivo del presente estudio fue describir la morfología de la onda espectral y los valores de referencia de la VPS, VFD, IR e IP de las arterias testiculares en el perro (arteria supratesticular, marginal e intratesticulares) y determinar la existencia o no de una correlación entre los valores del IR de dichas arterias con la concentración y motilidad espermática.

Se utilizaron cinco perros de la raza Beagle con una edad media de 4 años (con un rango de edad entre 3-5 años) y un peso medio de 19 kg (con un rango de peso entre 16-23 kg).

Para el examen ecográfico de los testículos se empleó un ecógrafo (Logiq™500 Proseries, General Electric Medical System, Milwaukee, Wisconsin, USA), con una sonda electrónica lineal de 11 MHz. Durante el estudio ecográfico los animales no fueron sedados, para evitar alteraciones sobre el flujo sanguíneo testicular. La recogida seminal se realizó de forma individual, siempre en la misma franja horaria y por el mismo personal. Y únicamente se valoró la fracción espermática del eyaculado.

El estudio se dividió en dos experiencias. En la primera experiencia se realizaron un total de cinco ensayos consistentes en un examen ecográfico Doppler color y pulsado de las arterias testiculares de ambos testículos, con un intervalo de una semana entre ensayo y ensayo. En nuestra segunda experiencia a los cinco perros en estudio, semanalmente, durante un período de 15 semanas consecutivas se les realizó un examen ecográfico (siguiendo la misma metodología que la empleada en la primera experiencia) e inmediatamente después se procedía a la extracción y contrastación seminal, siendo valorados los parámetros de concentración y motilidad espermática, utilizando un sistema de análisis computerizado (Integrated Semen Analysis System (ISAS®) CASMA System, Proiser SL, Paterna, Valencia, España).

Para la interpretación de los datos obtenidos en las dos experiencias se utilizó un análisis estadístico SPSS versión 15.0 (SPSS

Inc, Chicago, III). En la primera experiencia se hizo un análisis de varianza usando el procedimiento MIXED y cuando los datos eran estadísticamente significativos ($p < 0.05$) se compararon usando el test de Bonferroni. En el caso de la experiencia 2, los valores del IR de las distintas arterias testiculares se analizaron por el test de Friedman, para confirmar que dichos valores se mantenían constantes durante todo el estudio. La correlación de los valores del IR con los parámetros espermáticos el mismo día de la evaluación ecográfica (Tiempo *a*) y tras un ciclo de espermatogénesis (aproximadamente 62 días) (Tiempo *b*) se realizó mediante el Coeficiente de Spearman, y se consideró significativa cuando $p < 0.05$. En las dos experiencias, los resultados se presentaron como la media \pm error típico.

En la primera experiencia, las arterias testiculares (arteria supratesticular, marginal e intratesticulares) se identificaron fácilmente con el Doppler color y pulsado, presentando un modelo de flujo espectral de baja resistencia. Se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de VPS, VFD, IR e IP entre las distintas arterias, la arteria supratesticular presentaba los mayores valores de los parámetros en estudio, disminuyendo gradualmente en la arteria marginal y encontrándose los valores más bajos en las arterias intratesticulares. Se observó este comportamiento en todos los ensayos. Los valores medios obtenidos en la arteria supratesticular fueron $15.32 \text{ cm/s} \pm 5.28$, $6.76 \text{ cm/s} \pm 1.88$, 0.53 ± 0.13 y 0.88 ± 0.39 para VPS, VFD, IR e IP respectivamente. En la arteria marginal, $10.72 \text{ cm/s} \pm 3.86$, $6.24 \text{ cm/s} \pm 2.19$, 0.41 ± 0.10 y 0.63 ± 0.20 para VPS, VFD, IR e IP respectivamente. Y en las arterias intratesticulares, $6.34 \text{ cm/s} \pm 1.51$, $4.10 \text{ cm/s} \pm 0.86$, 0.35 ± 0.07 y 0.49 ± 0.12 para

VPS, VFD, IR e IP respectivamente. Estos resultados podrían utilizarse como valores de referencia de los parámetros cuantitativos y semicuantitativos que definen a las arterias testiculares en la especie canina.

Con respecto a la segunda experiencia, observamos que los resultados obtenidos en este estudio sugieren la existencia de una correlación positiva estadísticamente significativa, aunque débil, entre el IR de las tres arterias testiculares analizadas (supratesticular, marginal e intratesticulares) y algunos de los parámetros que definen la calidad y motilidad seminal. Esta correlación estadística se evidenció para las tres arterias en estudio, tanto a Tiempo *a* (en el momento del ensayo) como a Tiempo *b* (tras un ciclo espermático).

Aunque se observaron correlaciones positivas estadísticamente significativas entre los valores del IR en todas las arterias en estudio y algunos parámetros de la motilidad espermática, estas fueron significativamente débiles. En las arterias intratesticulares se evidenciaron un mayor número de correlaciones positivas con los parámetros de motilidad progresiva, VSL, VAP, LIN, STR y BCF. Estas arterias fueron las únicas en las que se observó una correlación negativa significativa con la concentración espermática, por lo que a pesar de que serían necesarios futuros estudios con un mayor número de animales, la medición del IR en las arterias intratesticulares podría ser un parámetro predictor de la calidad seminal a nivel cuantitativo en el perro.

SUMMARY

9. SUMMARY

B-mode and Doppler ultrasound are frequently used for the diagnosis of reproductive disorders in the male dog. Pulsed Doppler has been used to describe the characteristics of the spectral waveform of the testicular artery and establish reference values of quantitative (peak systolic velocity, PSV; end-diastolic velocity, EDV) and semiquantitative (resistive index, RI; pulsatility index, PI) parameters in men as in the horse and dog. It has been reported that RI value of the testicular arteries in humans could be an indicator of spermatogenesis. In the dog, RI value has been reported to be a potential marker of semen quality. However, there is still little information about the semiquantitative and quantitative parameters of the testicular arteries and concerning their application as a predictor of sperm quality in the dog.

The purpose of the present study was to describe the morphology of the spectral waveform in the canine testicular arteries, determine reference values of the PSV, EDV, RI and PI in testicular arteries (supratesticular, marginal and intratesticular artery) and to evaluate possible correlation between RI values in testicular arteries and sperm concentration and motility in dogs.

Five male Beagle dogs with a mean age of 4 years (range 3-5 years old) and mean body weight of 19 kg (range 16-23 kg) were included. All ultrasonographic studies were performed using an 11 MHz. electronic transducer (LogiqTM500 Proseries, General Electric Medical System, Milwaukee, Wisconsin, USA). Animals were not sedated during ultrasonographic study to avoid abnormalities in testicular blood flow. Semen collection was performed individually, always in the same period of time and by the same researcher. Different ejaculate fractions were separately collected, excluding pre-sperm and prostatic fraction.

The study was divided into two experiences. In the first experience, colour and pulsed Doppler ultrasound analysis of the testicular arteries of both testicles were performed in each dog weekly during five weeks. In the second experience, an ultrasound examination (same as in the experience 1) and seminal extraction and contrasting were performed weekly for fifteen weeks in each dog. Parameters of sperm concentration and motility were evaluated using a computerized analysis system (Integrated Semen analysis System (ISAS®) CASMA, Proiser SL, Paterna, Valencia, Spain).

Summarized data is obtained as mean \pm standard errors (unless otherwise stated) that were calculated using routine descriptive statistical procedures and software (SPSS version 15.0. SPSS Inc, Chicago, Ill). In the first experiment, data was analysed using a MIXED procedure and when the data was statistically significant ($p < 0.05$) a Bonferroni test was employed. For experience 2, RI values of the different testicular arteries were analyzed using a Friedman test, to

confirm that these values remained constant during the whole study. To analyse correlation of RI values with sperm parameters in the same test (Time *a*) and after a cycle of spermatogenesis (approximately 62 days) (Time *b*) a Spearman coefficient was performed and was considered significant when $p < 0.05$.

Experience 1. Testicular arteries (supratesticular artery, marginal and intratesticular) were easily identified with colour and pulsed Doppler ultrasound, presenting a low-resistance vascular pattern. Statistically significant differences between the values of PSV, EDV, RI and PI between different arteries were observed. Supratesticular artery showed the highest values, followed by the marginal artery, while intratesticular arteries showed the lowest values of the evaluated parameters. This trend was observed in all 5 assays. Mean values obtained from PSV, EDV, RI and PI were $15.32 \text{ cm/s} \pm 5.28$, $6.76 \text{ cm/s} \pm 1.88$, 0.53 ± 0.13 and 0.88 ± 0.39 respectively for the supratesticular artery. For the marginal artery mean values were $10.72 \text{ cm/s} \pm 3.86$, $6.24 \text{ cm/s} \pm 2.19$, 0.41 ± 0.10 and 0.63 ± 0.20 for PSV, EDV, RI and PI respectively. And for the intratesticular arteries, mean values of PSV, EDV, RI and PI were $6.34 \text{ cm/s} \pm 1.51$, $4.10 \text{ cm/s} \pm 0.86$, 0.35 ± 0.07 and 0.49 ± 0.12 , respectively.

Experience 2. Statistically significant weak positive correlations between RI value in the three testicular arteries analyzed (supratesticular, marginal and intratesticular) and some of the parameters that define seminal quality and motility were observed. This statistical correlation was found for all the three arteries evaluated at

both times, Time *a* (at the time of assay) and Time *b* (after a spermatogenic cycle). The greatest number of positive correlations between RI values and parameters of sperm motility (progressive motility, VSL, VAP, LIN, STR and BCF) was observed in intratesticular arteries, including the only statistically significant negative correlation between RI values of this artery with sperm concentration.

The observed data suggest, that supratesticular, marginal and intratesticular arteries are vessels with low-resistance spectral waveform pattern. There are statistically significant differences between the values of the quantitative (VFD VPS) and semiquantitative (RI, PI) parameters between these arteries, showing higher values in supratesticular artery and lower values in intratesticular arteries. The mean values obtained from VFD, VPS, RI and PI could be used as reference values for spectral Doppler in dogs.

Statistically significant positive correlations were observed between RI values of all studied arteries and some parameters of sperm motility. Although these correlations were weak, intratesticular arteries showed the greatest number of positive correlation, and the only negative correlation between RI values and sperm concentration. In conclusion, although further studies would be necessary with a larger number of animals, RI measurement in intratesticular arteries could be used as a quantitative predictor of semen quality in the dog.

BIBLIOGRAFÍA

Albrizio M, Siniscalchi M, Sasso R, Quaranta A. Effects of the environment on dog semen parameters and testosterone concentration. *Theriogenology*. 2013; 15(7): 800-804.

Al-Naffakh H. Testicular Doppler resistive index parameter as predictor test for male infertility. *Kufa Medical Journal*. 2012; 15 (1): 293-298.

Atilla MK, Sargin H, Yilmaz Y, Odabas O, Keskin A, Aydin S. Undescended testes in adults: clinical significance of resistive index values of the testicular artery measured by Doppler ultrasound as a predictor of testicular histology. *Journal of Urology*. 1997; 158 (3): 841-843.

Aydos K, Baltaci S, Salih M, Anafarta K, Bedük Y, Gülsoy U. Use of colour Doppler sonography in the evaluation of varicoceles. *European Urology*. 1993; 24 (2): 221-225.

Battaglia C, Giulini S, Regnani G, Madgar I, Facchinetti F, Volpe A. Intratesticular Doppler flow, seminal plasma nitrites/nitrates, and nonobstructive sperm extraction from patients with obstructive and nonobstructive azoospermia. *Fertility and Sterility*. 2001; 75 (6): 1088-1094.

Bergh A, Damber JE. Vascular controls in testicular physiology. En: de Kretser DM (ed). *Molecular Biology of the Male Reproductive System*. New York: Academic Press. 1993. p. 439-468.

Bergh A, Collin O, Lissbrant E. Effects of acute graded reductions in testicular blood flow on testicular morphology in the adult rat. *Biology of Reproduction*. 2001; 64 (1): 13-20.

Biagiotti G, Cavallini G, Modenini F, Vitali G, Gianaroli L. Spermatogenesis and spectral echo-colour Doppler traces from the main testicular artery. *British Journal of Urology International*. 2002; 90 (9): 903-908.

Bright L, England G. 2011. Testicular ultrasound and semen quality in the dog. En: BSAVA Congress 2011 Scientific Proceedings: Veterinary Programme. Gloucestershire; British Small Animal Veterinary Association. Reino Unido. 2011.

Bumin M, Kaya Ü, Kaya M, Kib A, Alkan Z. Gray-scale, colour and power Doppler sonography of scrotal disorders in dogs. *Revue de Médecine Vétérinaire*. 2007; 158 (3): 128-133.

Correa JR, Zarvos PM. The hypo-osmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. *Theriogenology*. 1994; 42 (2): 351-360.

Cremades T, Roca J, Rodríguez-Martínez H, Abaigar T, Vázquez JM, Martínez EA. Kinematic changes during the cryopreservation of boar spermatozoa. *Journal of Andrology*. 2005; 26 (5): 610-618.

Damber JE, Bergh A. Testicular microcirculation a forgotten essential in andrology. *International Journal of Andrology*. 1992; 15 (4): 285-292.

Dubinsky TJ, Chen P, Maklad N. Colour-flow and power Doppler imaging of the testes. *World Journal of Urology*. 1998; 16 (1): 35-40.

Ellenport C. Aparato urogenital de los carnívoros. *En: Sisson S, Grossman J (eds). Anatomía de los animales domésticos. Zaragoza: Salvat. 1985. p. 1732.*

England GC, Allen W. Factors affecting the viability of canine spermatozoa. II. Effects of seminal plasma and blood. *Theriogenology*. 1992; 37 (2): 373-381.

England GC, Plummer JM. Hypo-osmotic swelling of dog spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1993; Suppl 47: 261-270.

England GC. Ultrasonographic diagnosis of non-palpable Sertoli cell tumours in infertile dogs. *Journal of Small Animal Practice*. 1995; 36 (11): 476-480.

England GC, Ponzio P. Comparison of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen. *Theriogenology*. 1996; 46 (2): 165-171.

England GC. Semen quality in dogs and the influence of a short-interval second ejaculation. *Theriogenology*. 1999; 52 (6): 981-986.

Evans H, Christensen G. The urogenital system. En: Evans HE (ed). Miller's anatomy of the dog. Philadelphia: Saunders. 1993. p. 509.

Eytan O, Har-Toov J, Fait G, Yavetz H, Hauser R, Yogev L, et al. Vascularity index distribution within the testis: a technique for guiding testicular sperm extraction. *Ultrasound in Medicine & Biology*. 2001; 27 (9): 1171-1176.

Fazano F, Burmeister ML, de Lucio MA, Bottcher Luiz F, Neves PA, Bahamondes L. Correlation between hypo-osmotic swelling test and "water test" to assess human sperm membrane integrity. *Andrologia*. 1993; 25 (6): 351-353.

Feldman E, Nelson R. Evaluación clínica y diagnóstica del aparato reproductor del macho canino. En: Feldman EC, Nelson RW (eds). Endocrinología y reproducción canina y felina. 3ª edición. Buenos Aires: Inter-médica. 2007. p. 1038-1050.

Foresta C, Garolla A, Bettella A, Ferlin A, Rossato M, Candiani F. Doppler ultrasound of the testis in azoospermic subjects as a parameter of testicular function. *Human Reproduction*. 1998; 13 (11): 3090-3093.

Goericke-Pesch S, Failing K. Retrospective analysis of canine semen evaluations with special emphasis on the use of the hypoosmotic swelling (HOS) test and acrosomal evaluation using Spermac. *Reproduction in Domestic Animals*. 2013; 48 (2): 213-217.

Günzel-Apel AR, Mohrke C, Poulsen Nautrup C. Colour-coded and pulsed Doppler sonography of the canine testis, epididymis and prostate gland: physiological and pathological findings. *Reproduction in Domestic Animals*. 2001; 36 (5): 236-240.

Gumbsch P, Gabler C, Holzmann A. Colour-coded duplex sonography of the testes of dogs. *Veterinary Record*. 2002; 151 (5): 140-144.

Har-Toov J, Fait G, Houser R, Wolman I, Yavez H, Jaffa A. Can Doppler ultrasonographic measurements of the testis predict spermatozoa retrieval in azoospermic patients undergoing testicular biopsy? *Fertility and Sterility*. 2001; 76 (6): 1276-1277.

Hecht S, King R, Tidwell AS, Gorman SC. Ultrasound diagnosis: intra-abdominal torsion of a non-neoplastic testicle in a cryptorchid dog. *Veterinary Radiology and Ultrasound*. 2004; 45 (1): 58-61.

Henning H, Masal C, Herr A, Wolf K, Urhausen C, Beineke A, et al. Effect of short-term scrotal hyperthermia on spermatological parameters, testicular blood flow and gonadal tissue in dogs. *Reproduction in Domestic Animals*. 2014; 49 (1): 145-157.

Herwig R, Tosun K, Pinggera GM, Soelder E, Moeller KT, Pallwein L, et al. Tissue perfusion essential for spermatogenesis and outcome of testicular sperm extraction (TESE) for assisted reproduction. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2004; 21 (5): 175-180.

Herwig R, Tosun K, Schuster A, Rehder P, Glodny B, Wildt L, et al. Tissue perfusion controlled guided biopsies are essential for the outcome of testicular sperm extraction. *Fertility and Sterility*. 2007; 87 (5): 1071-1076.

Hewitt D. Fisiología y endocrinología del macho. En: England GCW, Harvey MJ, Simpsom GM (eds). Manual de reproducción y neonatología en pequeños animales. Barcelona: Ediciones S. 2000. p. 79-118.

Horstman W, Middlenton W, Melson G, Siegel BA. Colour Doppler US of the scrotum. *RadioGraphics*. 1991; 11 (6): 941-957.

Hsu TH, Huang JK, Ho DM, Liu RS, Chen MT, Chang LS. Role of the spermatic artery in spermatogenesis of sex hormone synthesis. *Archives of Andrology*. 1993; 31 (3): 191-197.

Hsu HS, Chang LS, Chen MT, Wei YH. Decreased blood flow and defective energy metabolism in the varicocele-bearing testicles of rats. *European Urology*. 1994; 25 (1): 71-75.

Illera M. Sistema reproductor del macho y su control endocrino. En: Illera M (ed). Reproducción de los animales domésticos. Barcelona: AEDOS. 1994. p. 97-130.

Jee WH, Choe BY, Byun JY, Shinn KS, Hwang TK. Resistive index of the intrascrotal artery in scrotal inflammatory disease. *Acta Radiológica*. 1997; 38 (6): 1026–1030.

Jeyendran RS, Van der Ven HH, Pérez-Peláez M, Crabo BG, Zaneveld LJD. Development of an assay to assess functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1984; 70 (1): 219-228.

Johnston GR, Feeney DA, Rivers D, Walter PA. Diagnostic imaging of the male canine reproductive organs. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 1991a; 21 (3): 553-589.

Johnston GR, Feeney DA, Johnston S, O'Brien T. Ultrasonographic features of testicular neoplasia in dogs: 16 cases (1980-1988). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1991b; 198 (10): 1779-1784.

Johnston S, Root Kustritz M, Olson P. Sexual differentiation and normal anatomy. En: Johnston S, Root Kustritz M, Olson P (eds). Canine and feline theriogenology. Pennsylvania: W.B. Saunders Company. 2001. p. 275-286.

Karger S, Arlt S, Haimerl P, Heuwieser W. A systematic review of studies performing the hypo-osmotic swelling test to evaluate the quality of canine spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*. 2014; 49 (1): 1-6.

Kawakami E, Hori T, Tsutsui T. Changes in plasma LH and testosterone levels and semen quality after a single injection of hCG in two dogs with spermatogenic dysfunction. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 1998; 60 (6): 765-767.

Kay GW, Grobbelaar JA, Hattingh J. Effect of surgical restriction of growth of the testicular artery on testis size and histology in bulls. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1992; 96 (2): 549-553.

Kerr JB. Temperature, effects on testicular function. *En: Knobil E, Neil J (eds). Encyclopaedia of Reproduction. Volume 4. California: Academic Press. 1999. p. 725-734.*

Kremkau FW. Doppler principles. *En: Kremkau Federick W (ed). Sonography: Principles and instruments. 8th edition. Missouri: Elsevier Saunders. 2006. p. 157-177.*

Kumi-Diaka J. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. *Theriogenology*. 1993; 39 (6): 1279-1289.

Kutzler MA. Semen collection in the dog. *Theriogenology*. 2005; 64 (3): 747-754.

Lamb C, Boswood A. Doppler ultrasound examination in dogs and cats. 1. The principles. *In Practice*. 2005; 27 (4): 183-189.

Lavoipierre AM. Ultrasound of the prostate and testicles. *World Journal of Surgery*. 2000; 24 (2): 198-207.

Lechniak D, Kedzierski A, Stanislawski D. The use of HOS test to evaluate membrane functionality of boar sperm capacitated in vitro. *Reproduction in Domestic Animals*. 2002; 37 (6): 379-380.

Martins-Bessa A, Rocha A, Mayenco-Aguirre A. Comparing ethylene glycol with glycerol for cryopreservation of canine semen in egg-yolk TRIS extenders. *Theriogenology*. 2006; 66 (9): 2047-2055.

Middlenton WD, Thorne DA, Melson GL. Colour Doppler ultrasound of the normal testis. *American Journal of Roentgenology*. 1989; 152 (2): 293-297.

Nagai A, Watanabe M, Nasu Y, Iguchi H, Kusumi N, Kumon H. Analysis of human ejaculation using colour Doppler ultrasonography: a comparison between antegrade and retrograde ejaculation. *Urology*. 2005; 65 (2): 365-368.

Neild DM, Chaves M, Flores M, Mora N, Beconi M, Aguero A. Hypo-osmotic test in equine spermatozoa. *Theriogenology*. 1999; 51 (4): 721-727.

Nie GJ, Wenzel JG. Adaption of the hypo-osmotic swelling test to assess functional integrity of stallion spermatozoal plasma membranes. *Theriogenology*. 2001; 55 (4): 1005-1018.

Niżański W, Partyka A, Rijsselaere T. Use of fluorescent staining and flow cytometry for canine semen assessment. *Reproduction in Domestic Animals*. 2012; 47 (6): 215-221.

Nolte T, Harleman JH, Jahn W. Histopathology of chemically induced testicular atrophy in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 1995; 47 (4): 267-286.

Nyland TG, Mattoon J, Herrgesell EJ, Wisner ER. Physical principles, instrumentation and safety of diagnostic ultrasound. En: Nyland TG, Mattoon J (eds). *Small animal diagnostic ultrasound*. 2th edition. Philadelphia: W.B. Saunders Company. 2002. p. 12-18.

Ober CP, Spaulding K, Breitschwerdt EB, Malarkey DE, Hegarty BC. Orchitis in two dogs with Rocky Mountain spotted fever. *Veterinary Radiology and Ultrasound*. 2004; 45 (5): 458-465.

Oosterhuis GJ, Hampsink RM, Michgelsen HW, Velmes I. Hypo-osmotic swelling test. A reliable screening assay for routine semen specimen quality screening. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 1996; 10 (4): 209-212.

Peña AI. Supervivencia y fertilidad del semen canino sometido a congelación-descongelación [Tesis Doctoral]. Santiago de Compostela. Universidad de Santiago de Compostela. 1997.

Peña AI. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Animal Reproduction Science*. 2004; 82-83: 209-224.

Pinggera GM, Mitterberger M, Bartsch G, Strasser H, Gradl J, Aigner F, et al. Assessment of the intratesticular resistive index by colour Doppler ultrasonography measurements as a predictor of spermatogenesis. *British Journal of Urology International*. 2008; 101 (6): 722-726.

Pozor MA, McDonnell SM. 2004. Colour Doppler ultrasound evaluation of testicular blood flow in stallions. *Theriogenology*. 2004; 61 (5): 799-810.

Pugh C, Konde L, Park R. Testicular ultrasound in the normal dog. *Veterinary Radiology*. 1990; 31 (4): 195-199.

Rijsselaere T, Van Soom A, Hoflack G, Maes D, de Kruif A. Automated sperm morphometry and morphology analysis of canine semen by the Hamilton-Thorne analyser. *Theriogenology*. 2004; 62 (7): 1292-1306.

Rijsselaere T, Maes D, Hoflack G, de Kruif A, Van Soom A. Effect of body weight, age and breeding history on canine sperm

quality parameters measured by the Hamilton-Thorne analyser. *Reproduction in Domestic Animals*. 2007; 42 (2): 143-148.

Rijsselaere T, Van Soom A, Maes D, Nizanski W. Computer-assisted sperm analysis in dogs and cats: An update after 20 years. *Reproduction in Domestic Animals*. 2012; 47 (6): 204-207.

Root M. Alteraciones testiculares y del epidídimo. En: Root Kustritz MV (ed). Manual de reproducción del perro y del gato. Barcelona: Multimedia Ediciones Veterinarias. 2005. p. 203.

Schäfer-Somi S, Aurich C. Use of a new computer-assisted sperm analyzer for the assessment of motility and viability of dog spermatozoa and evaluation of four different semen extenders for predilution. *Animal Reproduction Science*. 2007; 102 (1-2): 1-13.

Schwarze E, Schröder L. Los órganos genitales. En: Schwarze E (ed). Compendio de anatomía veterinaria. Sistema visceral. Zaragoza: Acribia. 1970. p. 251-254.

Schurich M, Aigner F, Frauscher F, Pallwein L. The role of ultrasound in assessment of male fertility. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2009; 144 (1): 192-198.

Senger PL. The organization and function of the male reproductive system. En: Senger PL (ed). Pathways to pregnancy and parturition. Washington: Current Conception, Inc. 2003. p. 71-74.

Setchell BP, Maddocks S, Brooks DE. Anatomy, vasculature, innervation and fluids of the male reproductive tract. En: Knobil E, Neill JD (eds). *The physiology of reproduction*. 2th edition. New York: Raven Press. 1994. p. 1063-1175.

Soares JM, Avelar GF, França LR. The seminiferous epithelium cycle and its duration in different breeds of dog (*Canis familiaris*). *Journal of Anatomy*. 2009; 215 (4): 462-471.

Souza CAB, Cunha-Filho JSL, Fagundes P, Freitas FM, Passos EP. Sperm recovery prediction in azoospermic patients using Doppler ultrasonography. *International Urology and Nephrology*. 2005; 37 (3): 535-540.

Souza MB, Da Cunha Barbosa C, Pereira BS, Monteiro CL, Pinto JN, Linhares JC, et al. Doppler velocimetric parameters of the testicular artery in healthy dogs. *Research in Veterinary Science*. 2014; 96 (6): 533-536.

Sriprasad S, Kooiman GG, Muir GH, Sidhy PS. Acute segmental testicular infarction: differentiation from tumour using high frequency colour Doppler ultrasound. *British Journal of Radiology*. 2001; 74 (886): 965-967.

Szatmari V, Sotonyi P, Vörös K. Normal Duplex Doppler waveform of major abdominal blood vessels in dogs: a review. *Veterinary Radiology and Ultrasound*. 2001; 42 (2): 93-107.

Tarhan F, Erbay ME, Erdogan E, Ozgul A, Kuyumcuoglu U. Effects of unilateral testicular torsion on the blood flow of contralateral testis – an experimental study on dog. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology*. 2000; 34 (4): 229-232.

Ünsal A, Turgut AT, Taskin F, Kosar U, Karaman CZ. Resistance and pulsatility index increase in capsular branches of testicular artery: Indicator of impaired testicular microcirculation in varicocele? *Journal Clinical Ultrasound*. 2007; 35 (4): 191-195.

Verstegen JP, Iguer-Ouada M, Onclin K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*. 2002; 57 (1): 149-179.

Verstegen JP, Onclin K, Iguer-Ouada M. Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris-glucose extender: in vitro and in vivo studies. *Theriogenology*. 2005; 64 (3): 720-733.

Williamson M. Ultrasonografía fundamental. Philadelphia: WB. Saunders. 1998.

Zelli R, Orlandi R, Troisi A, Cardinali L, Polisca A. Power and pulsed Doppler evaluation of prostatic artery blood flow in normal and benign prostatic hyperplasia-affected dogs. *Reproduction in Domestic Animal*. 2013a; 48 (5): 768-773.

Zelli R, Troisi A, Ngonput AE, Cardinali L, Polisca A. Evaluation of testicular artery blood flow by Doppler ultrasonography as a predictor of spermatogenesis in the dog. *Research in Veterinary Science*. 2013b; 95(2): 632-637.

Zirkin BR. Hormonal control of spermatogenesis. *En: Knobil E, Neill JD (eds). Encyclopaedia of Reproduction. Volume 4. Oxford: Academic Press. 1999. p. 556-562.*

Zwiebel WJ, Benson CB, Doubilet PM. Duplex ultrasound Evaluation of the male genitalia. *En: Zwiebel WJ, Pellerito JS (eds). Introduction to vascular ultrasonography. 5th edition. Philadelphia: Elsevier Saunders. 2005. p. 659-662.*

Zwiebel WJ, Pellerito JS. Basic concepts of Doppler frequency spectrum analysis and ultrasound blood flow imaging. *En: Zwiebel WJ, Pellerito JS (eds). Introduction to vascular ultrasonography. 5th edition. Philadelphia: Elsevier Saunders. 2005. p. 61-79.*

