

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL



Evaluación de la motilidad espermática en caballos $\frac{1}{4}$ de milla

Por:

DIEGO ALBERTO LÓPEZ ÁGUILA

TESIS

Presentada como Requisito Parcial para Obtener el Título de:

INGENIERO AGRÓNOMO ZOOTECNISTA

Saltillo, Coahuila, México

Diciembre 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL

Evaluación de la motilidad espermática en caballos $\frac{1}{4}$ de milla

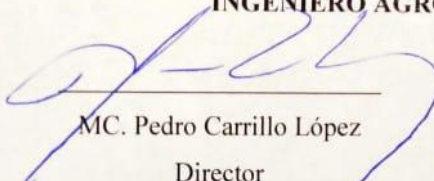
POR:

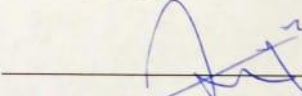
DIEGO ALBERTO LÓPEZ ÁGUILA

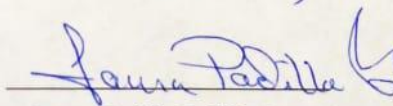
TESIS

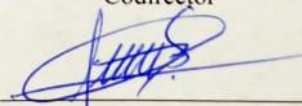
Que somete a la consideración del H. Jurado Examinador como requisito para obtener el título de:

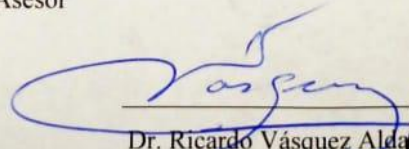
INGENIERO AGRÓNOMO ZOOTECNISTA


MC. Pedro Carrillo López
Director


Dr. Joel Ventura Ríos
Codirector


Dra. Laura Emilia Padilla González
Asesor


Dr. Alejandro García Salas
Asesor


Dr. Ricardo Vásquez Aldape
Coordinador Interino de la División de Ciencia Animal



Saltillo, Coahuila, México

Diciembre 2022.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a mi padre **Dios** por haberme permitido llegar hasta el final de mi trayectoria universitaria lleno de salud, por ampararme durante toda mi estancia fuera de casa y por darme la oportunidad de culminar una aventura tan importante en mi vida.

A mi “**ALMA TERRA MATER**” la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro** por haberme abierto las puertas para formarme profesionalmente y por ser mi segunda casa donde siempre me sentí acogido como en mi propio hogar.

A mi familia **López Águila** de quien provengo natalmente, mis padres **Carlos López** y **Bertha Águila**, y mis hermanos **Omar López Águila** y **Viridiana López Águila**, porque siempre estuvieron presentes cuando necesité de su apoyo tanto económico como emocional y me demostraron ser una familia llena de amor y cariño.

A mi novia **Rosalía Sánchez Jiménez** por ser mi compañera de vida durante toda mi carrera universitaria, por brindarme tanto amor a pesar de la distancia, por siempre tratar de hacer mis días más felices, aunque la situación estuviera difícil y por nunca dejarme solo sin importar las circunstancias.

Al **Departamento de Producción Animal** por brindarme sus instalaciones para mi formación profesional y al personal de esta área que en algún momento me dio la mano cuando lo necesité.

Al **M.C. Pedro Carrillo López** por aceptarme en este nuevo proyecto de investigación que juntos iniciamos, por darme todo su apoyo y asesorarme cuando lo necesité y sobre todo por brindarme su gran amistad que me llevó a apreciarlo mucho.

Al **Dr. Joel Ventura Ríos** por haber sido parte de este proyecto de investigación en el cual me ayudó a enriquecer mis conocimientos sobre el tema, por aclarar mis dudas, corregir mis errores y más que nada por brindarme su amistad dentro y fuera del campo laboral.

A la **Dra. Laura Emilia Padilla González** por formar parte de este proyecto de investigación, y por tanto cariño brindado hacia mi persona como una muestra de amistad.

Al **Dr. Alejandro García Salas** por todas las atenciones recibidas, por las correcciones en mi redacción, por el apoyo con mi análisis estadístico, por brindarme información para prepararme en este proyecto y por su amistad que con poco tiempo de conocerlo pude apreciarlo mucho.

Al **M.C. Fidel Maximiano Peña Ramos** por su grandísimo apoyo en la ejecución de mi análisis estadístico bajo el programa R-project, por todas las atenciones a mis problemas y por brindarme toda su confianza.

A todo el equipo de **Clínica y Reproducción Equina BIOCREA** en especial al **M.V.Z. Juan Garza García** y a la **M.V.Z. Samaria Abilene Del Ángel Cazarez** por haberme aceptado en su empresa para ejercer mis prácticas profesionales, por permitirme realizar mi proyecto de investigación dentro de sus instalaciones, por aportarme el equipo y animales necesarios para las colectas y evaluaciones de semen y por brindarme su gran amistad.

A mi compañera y amiga de prácticas profesionales **M.V.Z. Karla Elvira Cavazos Solís** por haberse rifado en mi proyecto de investigación apoyándome durante las colectas y evaluaciones de semen.

A mi buen amigo **M.C. Abel Hipolito Ruiz** por las correcciones hechas en mi redacción, por ayudarme a entregar un trabajo de mejor calidad y por brindarme su gran amistad.

A todos los miembros del equipo de los **Charros de la Narro** que en su momento pude tener la dicha de entrenar y charrear junto con ellos, de quienes aprendí mucho de este hermoso deporte.

A todos mis amigos del **Pino** en especial a **Antonio López, Carlos Padrón, Salma Galván, Griselda Ducoing, Magaly Campa, Jaziel Ovilla, Clarisa Sandoval, Raúl Valdez, Lizbeth Reynaga, Rutilio Torres y Benjamín López** quienes en su momento se volvieron mi familia Buitre y me supieron brindar una amistad muy bonita llena de tantas risas, aventuras y locuras.

DEDICATORIA

Con mucho amor, admiración y respeto les dedico esta labor a mis padres:

Carlos Alberto López Sánchez y Bertha Alicia Águila Ocegüera

Queridos papá y mamá, antes que nada, quiero que sepan que estoy infinitamente agradecido con ustedes por haberme dado la oportunidad y la libertad de estudiar una carrera que me ayudara a sustentarme propiamente.

Es por eso que quiero dedicarles el presente documento como prueba y evidencia de que todo su esfuerzo, todo su apoyo y todas sus oraciones al fin han brindado frutos.

Solo es una pequeña muestra en comparación con todo lo que ustedes hicieron por mí para lograr ser lo que ahora soy, pero créanme que, si Dios me lo permite, algún día se los voy a regresar multiplicado por mil, porque ustedes se merecen eso y mucho más.

Con amor, su hijo Diego.

DECLARATORIA DE NO PLAGIO

Saltillo, Coahuila, México, diciembre de 2022

DECLARO QUE:

El estudio de investigación titulado "Evaluación de la motilidad espermática en caballos ¼ de milla" es una producción personal, donde no se ha copiado, replicado, utilizado ideas, citas integrales e ilustraciones diversas, obtenidas de cualquier tesis, obra intelectual, artículo, memoria, (en versión digital o impresa), sin mencionar de forma clara y exacta su origen o autor.

En este sentido, lo anterior puede ser confirmado por el lector, estando consciente de que en caso de comprobarse plagio en el texto o que no se respetaron los derechos de autor; esto será objeto de sanciones del Comité Editorial y/o legales a las que haya lugar; quedando, por tanto, anulado el presente documento académico sin derecho a la aprobación del mismo, ni a un nuevo envío.

Atentamente



Diego Alberto López Águila

Evaluación de la motilidad espermática en caballos ¼ de milla

Diego Alberto López Águila

RESUMEN

La conservación de semen es una biotecnología reproductiva que está al alcance de técnicos interesados en la reproducción animal. La forma más común de conservar el semen equino es mediante refrigeración (5 °C), el cual nos permite trasladar el semen de un lugar a otro en un periodo de 48 a 72 horas. Los diluyentes disponibles en el mercado nos permiten alargar la vida de las células espermáticas a través de compuestos naturales o químicos. La criopreservación de semen (-196 °C) nos permite mantener las células espermáticas por periodos prolongados, eficientizando el uso del semen (millones de células) a través de pajillas. El objetivo principal de este estudio fue comparar la motilidad de los espermatozoides de caballos de la raza ¼ de milla a través del tiempo, a diferentes temperaturas.

Palabras clave: semen, criopreservación, motilidad, tiempo, temperatura, diluyente.

ABSTRACT

Semen conservation is a reproductive biotechnology that is within the reach of technicians interested in animal reproduction. The most common way to preserve equine semen is by refrigeration (5 °C), which allows us to move the semen from one place to another in a period of 48 to 72 hours. The extenders available on the market allow us to extend the life of sperm cells through natural or chemical compounds. Semen cryopreservation (-196 °C) allows us to keep sperm cells for prolonged periods, making the use of semen (millions of cells) more efficient through straws. The main objective of this study was to compare sperm motility of ¼ mile horses over time at different temperatures.

Keywords: semen, cryopreservation, motility, time, temperature, extender.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS.....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	V
I INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 OBJETIVO GENERAL	3
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
1.3 HIPÓTESIS	3
II REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA DEL APARATO REPRODUCTOR DEL CABALLO	4
2.1.1 Testículos.....	4
2.1.2 Escroto	5
2.1.3 Epidídimo	5
2.1.4 Cordón espermático.....	6
2.1.5 Anillo inguinal.....	6
2.1.6 Conducto deferente.....	7
2.1.7 Glándulas sexuales accesorias	7
2.1.8 Próstata	7
2.1.9 Ámpula	8
2.1.10 Vesículas seminales.....	8
2.1.11 Glándulas bulbouretrales	8
2.1.12 Pene	9
2.1.13 Prepucio.....	9
2.1.14 Uretra.....	9
2.2 ANATOMÍA DEL ESPERMATOZOIDE EQUINO	10
2.2.1 Morfología espermática.....	10
2.3 ESPERMATOGÉNESIS.....	12
2.4 MÉTODOS DE COLECTA DE SEMEN EQUINO	13
2.4.1 Vagina artificial	13
2.4.2 Preservativo	15

2.4.3 Masturbación	15
2.4.4 Colector cervical.....	15
2.4.5 Ex cópula.....	16
2.4.6 Extracción de espermatozoides de conducto epididimario	16
2.4.7 Electroeyaculación	17
2.5 EVALUACIÓN DEL SEMEN	17
2.5.1 Evaluación macroscópica	18
2.5.2 Evaluación microscópica.....	19
2.6 TIPOS DE PRESENTACIÓN DE SEMEN PARA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL (IA)	21
2.6.1 Semen fresco	21
2.6.2 Semen refrigerado	21
2.6.3 Semen congelado (criopreservación)	22
2.7 DILUYENTES.....	22
2.7.1 BotuSemen® GOLD.....	23
2.7.2 INRA 96®	24
2.8 CRIOPRESERVADORES	24
2.8.1 BotuCRIO®	25
2.8.2 Dimetilformamida (DMF).....	25
2.9 EQUIPURE™	26
2.10 SISTEMAS DE ANÁLISIS DE SEMEN ASISTIDO POR COMPUTADOR (CASA)	27
2.10.1 Sperm Class Analyzer® (SCA).....	27
2.10.2 iSperm mCASA.....	28
III MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
3.1 LOCALIZACIÓN DEL SITIO EXPERIMENTAL	30
3.2 MATERIALES PARA LA COLECTA DE SEMEN	30
3.3 MATERIALES PARA LA EVALUACIÓN DE SEMEN	31
3.4 MATERIALES PARA EL PROCESAMIENTO DE SEMEN	32
3.5 DESCRIPCIÓN DE LOS TRATAMIENTOS	33
3.5.1 Factores sobre los tratamientos	33
3.5.2 Modalidad en fresco	34

3.5.3 Modalidad en refrigerado	38
3.5.4 Modalidad en congelado.....	40
3.6 VARIABLES A EVALUAR.....	44
3.6.1 Motilidad	44
3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	44
IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
V CONCLUSIONES.....	51
VI LITERATURA CITADA.....	52

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos para la modalidad en fresco a 37 y 26 °C.....	37
Cuadro 2. Descripción de los tratamientos para la modalidad en refrigerado a 5 °C.....	39
Cuadro 3. Descripción de los tratamientos para la modalidad en congelado.....	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Lavado del pene del caballo antes de la colecta.....	37
Figura 2. Colecta de semen con vagina artificial tipo Colorado.....	38
Figura 3. Alteraciones estructurales y moleculares en espermatozoides de mamíferos después de la criopreservación.	43
Figura 4. Efecto del tiempo y el diluyente (BotuSemen® GOLD) sobre la motilidad espermática en equinos.	45
Figura 5. Efecto de la temperatura y el diluyente (BotuSemen® GOLD) sobre la motilidad espermática en equinos.	47
Figura 6. Motilidad del semen equino criopreservado con el diluyente (BotuSemen® GOLD) y con EquiPure™.....	48

I INTRODUCCIÓN

Hoy en día la industria equina es uno de los oficios que ha generado mayor demanda en el área de la reproducción, puesto que la gente que se dedica a esto sabe que conlleva a un trabajo en el que se requiere de mucha disciplina y responsabilidad porque los tiempos que se manejan son de suma importancia y se les tiene que dar prioridad para hacer un buen papel como profesionalista en reproducción. El desarrollo de la inseminación artificial ha incrementado el interés de investigadores y clínicos por las técnicas de procesamiento de semen, poniendo de manifiesto la necesidad de desarrollar técnicas que minimicen el daño espermático y a la vez que maximicen su viabilidad, supervivencia y fertilidad (Loomis, 2006).

Existen dos métodos de conservación de semen para mantener y alargar su periodo de fertilidad, refrigerado y criopreservado. La viabilidad espermática del semen refrigerado (5 °C) es capaz de mantenerse hasta por cuarenta y ocho horas de almacenamiento, sin embargo, para poder aplicar muchas de las ventajas de la IA, se requiere de un largo periodo de almacenamiento (Medeiros *et al.*, 2002), lo cual se puede lograr mediante la criopreservación del semen, debido a que esto permite trasladar el material genético a cualquier parte del mundo sin tener que mover al semental de su lugar de origen favoreciendo la reproducción del mismo simultáneamente incluso aun cuando el ejemplar haya muerto. Cabe mencionar que la calidad del semen congelado en ocasiones se ve comprometida por los daños celulares provocados por el proceso de congelar – descongelar, lo cual puede verse reflejado en las tasas de preñez post inseminación (Loomis, 2011; Amann y Graham, 1993). La congelación del semen equino permite conservar material genético de animales de alto valor, e incrementar el número de hembras servidas por eyaculado (Davies y Mina, 2003), además de prevenir el riesgo de transmisión de enfermedades venéreas (Loomis y Graham, 2008), minimizando la posibilidad de llegada de bacterias al útero potencialmente presentes durante la monta y causantes de endometritis, dado que el diluyente contiene antibiótico (Clement *et al.*, 1993). Existen diferencias individuales, solo el semen de algunos equinos responde favorablemente al proceso de congelación (Barbas y Mascarenhas, 2009). El 20 % de los sementales responden bien a la congelación (Tischner, 1979), el 60 % lo hacen de una manera aceptable y un 20 % son deficientes (Sieme *et al.*, 2008; Kuisma *et al.*, 2006) y los porcentajes de preñez varían entre 19 y 84 % (Barrier *et al.*, 2016).

La aceptación del semen congelado por importantes asociaciones equinas como la Asociación de Caballos Árabes, Asociación de Caballos Cuarto de Milla y Asociación de Caballos Pinto Americano han estimulado la investigación de protocolos para criopreservar semen equino (Giraldo *et al.*, 2006). Sin embargo, se ha estimado que sólo 30-40 % de los caballos producen semen apto para la criopreservación y se ha observado una consistente variación de la congelación de espermatozoides entre criaderos (Alvarenga *et al.*, 2004).

En otro estudio Squires, (2009) reporta porcentajes de preñez más altos utilizando la técnica de inseminación artificial con semen fresco (65-70 %), por otra parte, se ha utilizado semen refrigerado, donde se obtuvo una tasa de preñez del 50-60 %, así mismo se ha realizado la IA con semen congelado donde se reportan tasas de preñez de un 35-45 %. Precisamente el objetivo del presente estudio fue evaluar la motilidad del semen de caballos ¼ de milla a diferentes tiempos y temperaturas con la adición de un diluyente comercial.

1.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el comportamiento de espermatozoides de caballos de la raza ¼ de milla sobre la motilidad durante 24 horas a diferentes temperaturas usando un diluyente comercial.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar la temperatura óptima sobre la motilidad espermática en caballos ¼ de milla.

Evaluar la adición del diluyente BotuSemen® GOLD sobre la motilidad espermática en caballos ¼ de milla.

1.3 HIPÓTESIS

H₀ = Todos los tratamientos presentan la misma motilidad con o sin extender a diferentes temperaturas.

H₁ = La motilidad y viabilidad de los espermatozoides de equinos, se beneficia con la adición de un extender y conservándolo a una temperatura de 5 °C.

II REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Anatomía y fisiología del aparato reproductor del caballo

2.1.1 Testículos

Son las gónadas del macho, que originan los espermatozoides y las hormonas masculinas como la testosterona (Sánchez y Palacios, 2005). Se localizan en la región inguinal, recubiertos por el escroto, con sus ejes mayores orientados longitudinal y horizontalmente (Hillman *et al.*, 1983; Pickett *et al.*, 1989).

La superficie del testículo está cubierta por una membrana serosa, que es la túnica vaginal propia, la cual envuelve al testículo y al cordón espermático, dejando un sitio al descubierto por donde los vasos y nervios del cordón alcanzan al testículo (Sisson y Grossman, 1986).

La unidad funcional del testículo es el túbulo seminífero, constituido por tejido germinal, que es el que les da origen a los espermatozoides y está constituida por las células de Sertoli. El túbulo está forrado por células mioideas que impulsan el avance de los espermatozoides (Berndtson *et al.*, 1983; Andrade *et al.*, 2011).

Las células de Sertoli recubren toda la base del túbulo seminífero. Se encuentran estrechamente unidas a otras a través de desmosomas. Al no haber espacios entre ellas forman una barrera impermeable a la mayoría de las moléculas grandes. Esta barrera se conoce con barrera hemato-testicular. Debido a ella, las células del túbulo seminífero quedan aisladas del sistema inmune (Guerrero, 2015). Los testículos son más grandes y activos durante la época reproductiva, logrando su máximo tamaño durante los meses en que el fotoperiodo es más largo. (mayo a julio) A partir de agosto la actividad testicular disminuye, lo que puede resultar en menores concentraciones de testosterona circulante y en menor producción total a partir de septiembre u octubre. Sin embargo, a pesar de esta reducción estacional, el testículo equino no deja de producir totalmente espermatozoides en ninguna época del año. Por lo que los garañones son fértiles todo el año (Trejos, 2009).

2.1.2 Escroto

Es una bolsa en la que están situados los testículos y las partes adyacentes del cordón espermático, tiene forma globular, pero es asimétrico comúnmente, ya que un testículo mayormente el izquierdo es mayor y está ubicado un poco más caudalmente (Sisson y Grossman, 2005). El escroto se encuentra posicionado en la parte alta de la región inguinal constituido por dos bolsas bien delimitadas, por lo general de color negro u oscuro y presenta una ligera capa de vellosidades finas y cortas. Sus funciones principales son protección, contención física y termorregulación de los testículos y el epidídimo, de no ser así los testículos llegarían a atrofiarse y por lo tanto el caballo sería estéril.

El escroto está conformado por 4 capas:

- a.** La piel, que es delgada y elástica, generalmente de color oscuro o negro, lisa y untuosa. Presenta pelos finos y cortos diseminados, también están presentes glándulas sebáceas y sudoríparas muy voluminosas.
- b.** Dartos, de color rojizo e íntimamente adherido a la piel, excepto en la parte superior. Está constituido por tejido fibroelástico y fibras musculares no estriadas. A lo largo del rafe se forma un tabique que parte en dos bolsas al escroto, separando a los dos testículos.
- c.** Fascia escrotal, que se deriva aparentemente de los músculos oblicuos abdominales.
- d.** Capa parietal de la túnica vaginal, que contiene vasos y nervios (Sisson y Grossman, 1986; Voss y McKinnon, 1993).

2.1.3 Epidídimo

El epidídimo es el primer conducto externo que sale de los testículos, el cual está unido longitudinalmente a la superficie de los testículos (Bonilla, 2013). El epidídimo se sitúa a lo largo del borde dorsal y se proyecta un poco más allá de los polos testiculares. Es donde se

produce la maduración y el almacenamiento espermático. Consta de tres partes: cabeza, cuerpo y cola. La cabeza (*caput epididymis*) es una extensión de los ductos eferentes, su forma es chata y se encuentra adherida al testículo en su parte caudal. Su función es la reabsorción del exceso de fluido asociado con la espermatogénesis. El cuerpo (*corpus epididymis*) es tubular y está poco adherido a la superficie dorsal del testículo. La cola (*cauda epididymis*) tiene forma de circular a ovoide y al igual que el cuerpo está poco adherida al testículo. Estas dos últimas producen secreciones importantes para la maduración de los espermatozoides. A su vez, la cola los almacena hasta que ocurre la eyaculación (Dutra, *et al.*, 2013).

2.1.4 Cordón espermático

El cordón espermático comienza en el anillo inguinal profundo, donde sus partes constituyentes se unen y se extiende oblicua y ventralmente a través del canal inguinal, pasa sobre el lado del pene para terminar en el borde de inserción del testículo. (Sisson y Grossman, 2005). El cordón espermático consta de las siguientes partes: músculo cremáster, arteria y vena espermática, nervios simpáticos, conducto deferente, músculo cremáster interno y la capa visceral de la túnica vaginal (Ortega *et al.*, 2009). Tanto el cordón espermático como el escroto ayudan al sostén de los testículos, así mismo tienen la función conjunta de mantener la temperatura testicular aproximando los testículos al cuerpo cuando la temperatura ambiente es muy baja o dejarlos colgar apartados del cuerpo cuando aumenta. (Bonilla, 2013).

2.1.5 Anillo inguinal

El canal inguinal y sus anillos interno y externo forman un conducto oblicuo, en forma de hendidura en la pared abdominal por el cual pasan el proceso vaginal, el músculo cremáster y el cordón espermático formado a su vez por la arteria y venas testiculares, vasos linfáticos, nervios, musculatura lisa y por el conducto deferente. El canal se delimita caudomedialmente por el músculo oblicuo interno y por la inserción en la pared abdominal del músculo cremáster. Craneolateralmente se delimita por una solapa de la que forma parte el ligamento pélvico. Debido a que el canal tiene forma elíptica, no existe ninguna limitación específica craneal o caudal (Auer y Stick, 2012).

2.1.6 Conducto deferente

El conducto deferente es una estructura par, simétrica, que da continuidad al transporte espermático, tiene una gruesa capa muscular, las contracciones de dicha capa muscular son importantes para expulsar el semen durante la eyaculación (Araya *et al.*, 2004; Zarco y Boeta, 2000). El conducto deferente atraviesa la pared abdominal pasando entre el anillo inguinal externo y el interno, presentando la tercera porción del conducto deferente, llamada porción inguinal. Ya en la cavidad abdominal se forma la porción abdomino-pélvica, la cual se dirige lateral y posterior a la vejiga, que se dilata formando la ampolla que se une al conducto de las vesículas seminales y forma al conducto eyaculador, los cuales entran a la próstata y llegan a la uretra prostática (Velázquez, 2017).

2.1.7 Glándulas sexuales accesorias

Boyle, (1992); Galina y Valencia, (2008) mencionan que los espermatozoides recién eyaculados muestran vigorosa motilidad. La respuesta a esto radica en que las glándulas accesorias son las encargadas de activar a los espermatozoides una vez que pasan por la uretra y se mezclan con las secreciones de las mismas glándulas.

2.1.8 Próstata

Es una glándula de forma lobulada que asienta en el cuello de la vejiga y al principio de la uretra, ventral al recto. Está formada por dos lóbulos laterales y un istmo de conexión (Sisson y Grossman, 2005). La próstata está encerrada en una cápsula de tejido fibroso que contiene algunas fibras musculares no estriadas. La secreción prostática es de aspecto lechoso y posee un olor especial y característico. La próstata secreta fluidos accesorios para limpiar y lubricar la uretra durante la estimulación precoital. También contribuye con pequeños volúmenes para el semen (Pickett, 1989; Voss y McKinnon, 1993).

2.1.9 Ámpula

El conducto deferente tiene un ensanchamiento fusiforme llamado ámpula, esta es una estructura tubular de aproximadamente 0.7 a 2.0 cm de diámetro, que se forma inmediatamente antes de la unión del conducto deferente con la uretra (Sisson y Grossman, 1986; Voss y McKinnon, 1993).

2.1.10 Vesículas seminales

Son dos sacos piriformes elongados, que asientan a cada lado de la parte caudal de la superficie dorsal de la vejiga, en el semental equino tiene unos 15-20 cm de largo y su diámetro mayor es de unos 5 cm (Sisson y Grossman 2005; Koning y Liebich 2005). Las vesículas seminales se encuentran dentro del pliegue genital, lateralmente a las ámpulas. Producen secreciones voluminosas de un fluido gelatinoso que al momento de la eyaculación son vaciadas hacia la uretra, donde se unen a los espermatozoides provenientes del epidídimo (Galina y Valencia, 2008).

2.1.11 Glándulas bulbouretrales

Son dos glándulas que se sitúan a cada lado de la próstata, sus secreciones contribuyen con una pequeña porción del eyaculado (Galina y Valencia, 2008). Estas glándulas son pares, lobuladas, de forma ovoide y situada cerca del arco isquiático. Su medida en el semental es de unos 4cm de longitud y unos 2.5 cm de anchura y posee 6-8 conductos excretores que se abren a la uretra por detrás de los conductos prostáticos. (Rosadle, 1991; Sisson y Grossman, 2005; Koning y Liebich, 2005). Su función de las glándulas accesorias es la secreción del plasma seminal, el mismo que ayuda al transporte de los espermatozoides a través del tracto hasta la yegua (Trejos, 2009).

2.1.12 Pene

Es el órgano masculino de la copulación, tiene forma cilíndrica en estado de flacidez, mide cerca de 50 cm de largo y de 3 a 6 cm de diámetro, mientras que el pene erecto puede medir hasta 100 cm o más de largo. (Sisson y Grossman, 2005). El pene del equino no posee flexura sigmoidea; se divide en tres porciones: la raíz que se halla adherida al hueso de la pelvis; el cuerpo que es la porción central del pene; y el glande que es la parte terminal (Sánchez y Palacios, 2005).

2.1.13 Prepucio

Es una invaginación de la piel que contiene y cubre la porción libre del pene cuando no está en erección. Consta de dos partes, una externa y otra interna, la externa también conocida como vaina (Zarco y Boeta, 2000). Las glándulas sebáceas modificadas situadas en el prepucio secretan una secreción llamada “esmegma”, quien cumple la función de facilitar la introducción del órgano de la copula erecto dentro de los genitales de la hembra (Koning y Liebich, 2005).

2.1.14 Uretra

Es un tubo que se extiende de la vejiga hacia la última porción del pene. La porción pélvica de la uretra está envuelta por el músculo uretral, que se contrae vigorosamente durante la eyaculación. La uretra finaliza en una extensión libre llamada proceso uretral; sirve como canal excretorio de la orina y el semen (Sánchez y Palacios, 2005).

2.2 Anatomía del espermatozoide equino

2.2.1 Morfología espermática

El espermatozoide de los mamíferos consta de las regiones: cabeza, pieza intermedia, pieza principal y pieza terminal. Desde el punto de vista funcional, es un transportador de la información genética. Por ello, debemos destacar la presencia de un núcleo muy condensado, una membrana plasmática muy sensible a los cambios térmicos y osmóticos y las mitocondrias (Peña, 2011).

- **Cabeza:** La cabeza del espermatozoide es aplanada y está formada por el núcleo, el acrosoma, estructuras del citoesqueleto y una pequeña cantidad de citoplasma. El núcleo está constituido por cromatina altamente condensada, el acrosoma, el segmento ecuatorial y la fosa de implantación. El acrosoma se localiza en la porción anterior del núcleo y es una vesícula especializada que contiene enzimas hidrolíticas, necesarias para la penetración de la zona pelúcida del ovocito en la fecundación. La cromatina se encuentra compactada mediante proteínas específicas (protaminas) que se unen entre sí mediante puentes disulfuro. El segmento ecuatorial es una evaginación de la membrana plasmática del espermatozoide localizada en la porción media de la cabeza. Su fusión con la membrana plasmática del ovocito es fundamental para la fecundación. La fosa de implantación es el lugar de inserción del flagelo en la cabeza. En el 50 % de los casos y de forma fisiológica en el caballo, esta inserción de la cola no es central, sino abaxial. Por ello el patrón de motilidad progresiva en el caballo no es tan rectilíneo como en otras especies (Peña, 2011). La cabeza de los espermatozoides de mamíferos presenta importantes variaciones en la forma entre las diferentes especies (Lizaraso, 2009). Por ejemplo, es ovoide y discoidal en conejo, toro y cerdo, falciforme en ratón, rata y hámster, y algo aplanado y elipsoide en el hombre. En cambio, es elíptica en el caballo (Samper, 2009c).
- **Flagelo:** El flagelo es el responsable del movimiento y lo constituyen tres regiones: la pieza intermedia, la pieza principal y la pieza terminal. El flagelo está constituido en su

totalidad por el “axonema” que es la estructura que le confiere el movimiento. El axonema está formado por una serie de microtúbulos agrupados en dobletes y se distribuyen en uno central y nueve periféricos (Peña, 2011).

- **La Pieza Intermedia (PI):** Se caracteriza por la presencia de una doble hélice de mitocondrias. Estas organelas, además de ser las responsables del metabolismo energético y de la regulación de muerte celular, se ha comprobado recientemente que son la mayor fuente intracelular de especies reactivas de oxígeno (Koppers, 2010).
- **La Pieza Principal (PP):** constituye la porción mayor de la cola. Está formada por las 9 fibras densas y el axonema que se continúan desde la zona intermedia. Las fibras van reduciendo su tamaño hasta desaparecer al final de la PP (Peña, 2011). La pieza principal está rodeada por una capa fibrosa, y en la final está en contacto directo con la membrana plasmática (Olivera *et al.*, 2006).
- **La Pieza Terminal (PT):** constituye la pieza final de la cola, y está formada por el axonema, sin vaina fibrosa (Hess, 1999).

El espermatozoide está revestido por la membrana plasmática, compuesta por diferentes tipos de proteínas, fosfolípidos, colesterol, glucolípidos y carbohidratos. También posee enzimas en el acrosoma, que actúan como la barrera principal entre el espermatozoide y el ambiente externo, debido a su característica de permeabilidad selectiva (Amann y Graham, 2011; Ball *et al.*, 2006; Amann y Graham, 1993). El espermatozoide es una célula haploide altamente especializada que se originan en los túbulos seminíferos de los testículos, mediante un proceso denominado espermatogénesis. Estos túbulos seminíferos se encuentran tapizados por un gran número de células epiteliales germinales llamadas espermatogonias, que son células diploides que proliferan continuamente para mantener su número. Un porcentaje de estas células sufrirán una serie de modificaciones hasta transformarse en los gametos masculinos (Amann, 2008).

2.3 Espermatogénesis

Es el proceso de proliferación, maduración y diferenciación que tiene lugar en los túbulos seminíferos y mediante el cual las espermatogonias se transforman en espermatozoides. Este proceso consta de cuatro etapas consecutivas en las cuales, las células primordiales cambian su morfología, pierden algunas de sus organelas y se transforman en células diferenciadas (Amann, 2008). Los sementales equinos realizan la producción espermática por medio de un proceso conocido como espermatogénesis en el cual mediante una serie de eventos y fases consecutivas las células se transforman y cambian progresivamente en lugares específicos de los túbulos seminíferos, una espermatogonia da origen a un espermatozoide luego de procesos de diferenciación y maduración; este proceso dura alrededor de 57 días (Mejia, 2016).

Espermatocitogénesis: poco antes de llegar a la pubertad, los gonocitos germinales se diferencian a espermatogonias. En esta primera etapa, las espermatogonias experimentan una serie de divisiones mitóticas para mantener su número (espermatogonias tipo A) en primer lugar, y para producir espermatogonias tipo B que se dividirán nuevamente, dando espermatocitos primarios. **Espermatidogénesis:** en esta segunda fase comienza la primera división meiótica, mediante la cual el espermatocito primario diploide va a originar dos espermatocitos secundarios haploides. Posteriormente, se producirá la segunda meiosis en estos espermatocitos secundarios originando las espermatidas, que son células de menor tamaño y más diferenciadas. **Espermiogénesis:** la espermatida esférica sufre una serie de cambios morfológicos hasta diferenciar la cabeza y la cola; sin alterarse ya la carga genética. **Espermiación:** en esta última fase se rompen las uniones de la espermatida madura y las células de Sertoli quedando liberada al lumen de los túbulos seminíferos. La espermatida pierde la mayor parte del citoplasma, su núcleo se condensa, y se produce la maduración del flagelo y del acrosoma (Amann, 2008).

Amann, (2008) menciona que la espermatogénesis tiene una duración en el caballo de 52 días, mientras que en otras fuentes se establece que la espermatogénesis suele durar de 57 a 60 días en la especie equina. Gracias a esta información se puede decir que el proceso de espermatogénesis en el caballo tarda alrededor de dos meses.

Si tomamos como punto de partida la espermiación (liberación a la luz de los espermatozoides), el ciclo espermático serían todos los sucesos que ocurren desde una espermiación hasta la siguiente, en el caballo este proceso suele ser de unos 12 a 14 días, esto quiere decir que se necesitan entre 12 y 14 días para que los espermatozoides sean liberados, sin embargo, de antemano sabemos que se necesitan alrededor de dos meses para que un espermatozoide desde cero llegue a formarse y posteriormente pueda ser expulsado.

2.4 Métodos de colecta de semen equino

Los mejores resultados se obtienen cuando el reproductor ha agotado sus reservas espermáticas extragonadales, lo cual se logra mediante colectas o montas frecuentes. Esto permite obtener eyaculados homogéneos y concentraciones espermáticas constantes en los reproductores (Amann y Pickett, 1987). Para la colecta de semen se pueden emplear yeguas en celo preferiblemente, o maniqués artificiales, se requiere el uso de vagina artificial debidamente acondicionada (Kenney *et al.*, 1983; Varner *et al.*, 1991).

2.4.1 Vagina artificial

La vagina artificial es el método de elección para la recogida del semen en los caballos, mediante esta técnica podemos obtener una muestra del eyaculado con las mismas características que el de una monta natural (Yates y Whitacre, 1993; Gómez, 1996; Mateos, 1996; Crump, 1989; Mc Donnell y Love, 1991; Mc Donnell *et al.*, 1991). Existen varios modelos tales como el de Cambridge, Colorado, Missouri, Nishikawa y Hannover (Morel, 1999). Independientemente del modelo de la vagina artificial, todas tienen la función de crear un medio lo más parecido al de la vagina de la yegua en cuanto a temperatura y presión, propiciando a que se genere una serie de estímulos y así posteriormente se desencadene la eyaculación. Todas las vaginas artificiales

consisten en una caja externa y un forro interno de látex entre los cuales se infunde agua tibia y/o aire para proveer la presión y temperatura adecuadas. Normalmente se emplean temperaturas de 40 a 42 °C, cuando el caballo presenta problemas para eyacular es conveniente elevar ligeramente la temperatura del agua para mejorar el estímulo sobre el pene, en ningún caso se deben sobrepasar los 50 °C, una temperatura demasiado elevada provocará el rechazo del caballo a la vagina; como en muchos otros aspectos se encontrarán preferencias individuales respecto a la temperatura interna de la vagina (Dalmau, 2012).

Existen tres alternativas de colecta de semen cuando el método principal es mediante la vagina artificial:

- **Yegua en celo:** Para llevar a cabo la recolección necesitamos de una yegua en celo, una vez que el semental monta a la yegua, el pene es desviado hacia un lado y dirigido hacia la vagina artificial (Dalmau, 2012). Es importante mencionar que para esta alternativa se recomienda colocare un tirapié a la yegua para evitar que llegue a patear al semental, y sobre todo para disminuir el riesgo de algún accidente hacia el manejador del caballo y al encargado de colectar el semen.
- **Maniquí o domi:** El uso de un maniquí en lugar de la yegua provee de una monta más estable y reduce la variabilidad de las condiciones entre las recolecciones, reduciendo además el riesgo de accidentes para los animales y los operadores. La utilización del maniquí requiere un periodo de entrenamiento, inicialmente se coloca una yegua en estro junto al maniquí como estímulo sexual y tras varias recogidas y una vez que el macho asocia el maniquí con la monta y la eyaculación la hembra puede ser alejada y eventualmente se podrá prescindir de ella (Dalmau, 2012). Caballos con alteraciones neurológicas, generalmente muestran dificultad al momento de la intromisión y particularmente son incapaces de mantener la estabilidad encima de la hembra o maniquí (Benson y McDonnell, 2011). Es buena práctica ajustar el maniquí o la yegua a la altura del semental, proporcionarle agarres o lugares de fijación para que los caballos con cierta dificultad puedan trabajar mejor y que el área de colecta sea un ambiente tranquilo y libre de distracciones (McDonnell, 1992).

- **Cuadripedestación:** Los sementales que tienen lesiones músculoesqueléticas en extremidades, espalda, cuello o rodillas, así como problemas neurológicos, una cirugía de cólico reciente o simplemente porque no existe una yegua en estro o yegua fantasma, tienen que ser entrenados para eyacular en cuadripedestación utilizando técnicas de estimulación manual, aunque también pueden ser eyaculados con estimulación química (Boeta *et al.*, 2017).

2.4.2 Preservativo

El preservativo se emplea cuando no se dispone de vagina artificial o bien el caballo no la acepta. El preservativo se coloca sobre el pene en erección y debe recuperarse inmediatamente después de la cubrición evitando que caiga al suelo. La muestra obtenida mediante el preservativo es completa y representativa, sin embargo, debemos tener en cuenta que está más contaminado con bacterias y detritus del exterior del pene que el recolectado en vagina artificial y además el contacto prolongado de los espermatozoides con el látex puede alterar su motilidad, por estas razones y la incomodidad en su uso no debe ser empleado como primera opción para la obtención del semen (Yates y Whitacre, 1993).

2.4.3 Masturbación

La masturbación consiste en realizar la recogida del semen mediante el masaje del pene del caballo, normalmente con éste en estación sobre sus cuatro extremidades. Este tipo de recolección lleva consigo una labor ardua durante el periodo de entrenamiento, pero suele ser bien aceptado por los animales y es muy práctico y eficaz una vez que el semental está acostumbrado (Crump, 1994).

2.4.4 Colector cervical

El Colector Cervical consiste en un recipiente de cristal soplado de borosilicato, de un grosor constante de 2.2 a 3 mm, realizado mediante la técnica de soplado de cristal en su punto de fusión, en el que se aprecian con 3 partes diferenciadas:

- La boca
- La ampolla
- El cuerpo del colector

El colector cervical debe ser introducido a través de la vagina en el cérvix de la yegua en celo, por su extremo alargado que corresponde al cuerpo del colector que, tras ser introducido, debe presionarse sobre la ampolla para producir la dilatación del cérvix y la introducción de esta de manera que obture completamente la entrada de semen en el útero. Por último, la boca del colector debe ser cubierta completamente por los labios del cérvix para impedir que el semental detecte la presencia de este durante la cubrición (Dalmau, 2012).

2.4.5 Ex cópula

La inducción farmacológica ex cópula es recomendada para sementales con problemas físicos, hormonales, de libido, psicológicos, neurológicos o de comportamiento (McDonnell, 2001; Mrackova *et al.*, 2013). La xilacina, es un agonista alfa 2 adrenérgico comúnmente usado para provocar sedación y analgesia en caballos (Booth, 1988). Trabajos realizados con esta droga revelaron una tasa de éxito de 27 % en inducir la eyaculación ex copula en caballos. También es utilizada clínicamente para inducir la eyaculación en caballos con problemas neurológicos o de claudicación que impiden el acto copulatorio. La experiencia hasta el momento sugiere que las tasas de éxito dependen tanto del nivel de excitación sexual como del estado de ansiedad del caballo (calmo vs nervioso) al momento del tratamiento (McDonnell y Odian, 1994).

2.4.6 Extracción de espermatozoides de conducto epididimario

Los espermatozoides de epidídimo pueden obtenerse post mortem o tras una castración, de hecho, el primer potro nacido de semen congelado se obtuvo a partir de espermatozoides de epidídimo (Barker y Gandier, 1957). Se sabe que después de la muerte de un semental los espermatozoides del epidídimo permanecen viables durante un tiempo antes de que les afecte la descomposición (24 horas tras castración a temperatura ambiente) (Muradas *et al.*, 2006).

2.4.7 Electroeyaculación

Utilizando un electroeyaculador que produce descargas eléctricas de diferente intensidad y con frecuencia programable se excitan las vesículas seminales pudiéndose obtener un eyaculado. Esta técnica es muy utilizada en otras especies como en el vacuno o en especies salvajes para creación de bancos genéticos (Crump, 1994), pero en los équidos produce un gran sufrimiento que incluso puede llegar a la muerte del semental (Mc Donnell y Odian, 1994; Stover *et al.*, 1981). Además, la muestra recogida es de peor calidad o puede resultar contaminado con orina (Cary *et al.*, 2004), por lo que este método resulta ser poco efectivo y traumático para la especie equina.

2.5 Evaluación del semen

Una vez colectado el eyaculado, se procede a su filtración para la separación del gel y posterior evaluación de las características macro y microscópicas del semen (motilidad, morfología, concentración, bacteriología), en donde todos los equipos y materiales de laboratorio que entren en contacto con el semen deben estar a 37 °C (Cruz y Jaramillo, 2016). Esta fracción de gel, es la última secreción y tiene una concentración muy baja de espermatozoides. Se retira utilizando varios métodos: aspiración con jeringa estéril, filtración mediante un sistema incorporado a la vagina artificial, consiguiendo así eliminar residuos (Morel, 1999).

Posteriormente, se realiza la evaluación espermática de forma subjetiva, con microscopio de luz u objetiva a través de análisis computarizados (Morel, 1999). En el caso del análisis objetivo, el semen debe ser diluido, en tanto que en el análisis subjetivo se puede realizar sin dilución, aunque es deseable que se haga la dilución para garantizar una adecuada protección espermática contra las variaciones de temperatura ambiente, y para facilitar la acción del antibiótico presente en el diluyente (Varner *et al.*, 1991).

2.5.1 Evaluación macroscópica

El semen debe poseer una coloración blanquecina o grisácea-blanquecina cualquier otra coloración debe ser sospecha de una patología. Muestras con olor a orina y con una coloración amarillenta indican urospermia. La hemospermia se refiere a la contaminación del eyaculado con sangre (Boeta *et al.*, 2017).

- **Volumen:** Morel, (1999) afirma que el volumen normal de semen producido por semental varía considerablemente (30 – 250 ml), pero de media la mayoría de los sementales producen 100 ml y de este volumen 20-40 ml lo constituye la fracción de gel, mientras que Boeta *et al.* (2017) mencionan que el volumen promedio es de 60 a 70 ml (en un rango de 30–300 ml) por eyaculado.
- **Aspecto:** El semen fresco tiene una coloración que varía de gris ceniza a blanco y su consistencia puede variar de acuoso a lechoso. La detección de cambios en el color que pueden ser asociados a la presencia de detritos, sangre u orina, pueden afectar severamente la calidad del semen e indicar un desorden en el tracto reproductivo o urinario (Saltos, 2007).
- **pH:** Pickett, (1993) afirma que el pH esta inversamente correlacionado con la concentración, de manera que con concentraciones menores el pH tiende a ser mayor. En un reporte Amann *et al.* (1983), mencionan que el pH del semen equino varía entre 6.2 y 7.8, mientras que Kenney *et al.* (1983) señalan que el pH del semen equino varía entre 7.2 y 7.6.
- **Olor:** Propio característico.

2.5.2 Evaluación microscópica

El examen microscópico se lleva a cabo preferiblemente con un microscopio óptico con contraste de fase y una platina térmica a 40 °C (Brass, 2001). Por su parte, Amann *et al.* (1985) aseguran que, durante esta evaluación, que dura más o menos cinco minutos, el semen debe mantenerse a una temperatura de 38 °C.

- **Concentración:** La concentración indica el número de espermatozoides por unidad de volumen, la cual puede ser medida por medio de una cámara de Neubauer o con la ayuda de un espectrofotómetro. La concentración de semen se calcula generalmente como lo reportan Pickett, (1993) y Graham, (1996), que es mediante espectrofotometría, este método determina la cantidad de luz dispersada al atravesar una muestra y la concentración se determina por comparación con una curva Standard. La medida de la concentración mediante espectrofotometría tiene un alto costo cuando se analizan pocas muestras y pierde precisión en eyaculados poco concentrados o contaminados, en estos casos es preferible el uso de una cámara hemocitométrica, afirman Pickett, (1993) y Graham, (1996).

Para el recuento en la cámara de Neubauer puede ser utilizada una dilución de 1:20 o 1:40 en una solución fijadora de formol-salina o Hayem. La cámara se monta deslizando la lámina con presión sobre los bordes humedecidos hasta que se formen los anillos de Newton. Con una pipeta Pasteur se toma una alícuota de semen diluido y homogenizado y transfiere a cada hemicámara por medio de capilaridad entre el piso de la cámara y la lámina que la cubre. Después de la sedimentación las células son contadas (Brass, 2001). El rango varía de 150 a 300 x 10⁶ ml⁻¹, con una concentración total de 1 – 20 billones de espermatozoides en cada eyaculado. El número de espermatozoides producido por un caballo normal tiene relación con el tamaño testicular. Un gramo de parénquima testicular durante la época reproductiva produce aproximadamente 19 millones de espermatozoides día⁻¹ (Boeta *et al.*, 2017).

- **Motilidad:** Tras la recogida del eyaculado el primer parámetro que debemos analizar es la motilidad, debido a que ésta se altera por los cambios de temperatura y el tiempo de incubación. Después de la recolección se inicia una disminución progresiva de la motilidad espermática. Por eso la evaluación de la motilidad debe ser determinada inmediatamente o como máximo, 5 minutos después de la recolección (Brass, 2001). Para hacer el análisis de motilidad espermática es recomendable diluir el eyaculado con algún extender comercial, esto para facilitar la evaluación del mismo porque a veces cuando el semen viene muy concentrado, los espermatozoides suelen aglutinarse y el proceso de estimación se vuelve más complicado. Para una mejor evaluación el semen debe diluirse en un medio adecuado a una concentración constante entre 25 y 50×10^6 spz ml^{-1} (Hafez, 2002).
- **Motilidad progresiva:** La determinación de los porcentajes de motilidad progresiva es una evaluación subjetiva, y con un alto porcentaje de variación entre observadores. Sin embargo, provee al investigador de un valor cuantitativo de la calidad del movimiento de los espermatozoides. Para realizar esta evaluación se observa la porción media de la muestra, y se realiza un recorrido rápido a través de toda la placa para la determinación de las propiedades del desplazamiento espermático (Morrell, 2006). El semen deberá ser examinado usando un aumento de $400X$, esto consiste en la observación del movimiento que realiza el espermatozoide individual en línea recta por el campo macroscópico, el movimiento en círculos, la aglutinación o inmovilidad (Paredes, 2015).
- **Morfología:** Por lo menos el 50% de los espermatozoides debe ser morfológicamente normales para considerar que el semen es de buena calidad. En esta evaluación se determinan las alteraciones o anormalidades morfológicas existentes en los espermatozoides. Se evalúan mezclando una gota de semen con una gota de tinción; la más común es eosina–nigrosina. Los espermatozoides que se encuentran vivos cuando la tinción se aplica no se teñirán y se observarán de un color blanquecino o claro, mientras que los espermatozoides que están muertos se teñirán y se observarán de un color rosado (Boeta *et al.*, 2017).

Al evaluar la morfología de los espermatozoides es muy probable que se observen algunas anomalías en su estructura física; según reportan Boeta *et al.* (2017), se clasifican en:

- **Anormalidades 1º:** son resultado de alteraciones durante la espermatogénesis, por lo tanto, son de origen testicular; tales como defectos en la cabeza, acrosoma y gota citoplasmática proximal.
- **Anormalidades 2º:** éstas ocurren después de que el espermatozoide abandona los testículos para dirigirse a través del epidídimo y glándulas accesorias; aquí se pueden mencionar colas dobladas y gota citoplasmática distal.
- **Anormalidades 3º:** ocasionadas por una mala colección de semen y/o un mal manejo de este post-colección; aquí se incluyen cabezas sueltas, colas dobladas.

2.6 Tipos de presentación de semen para inseminación artificial (IA)

2.6.1 Semen fresco

Este semen es el que una vez colectado del semental, solo se retira la fracción gelatinosa por medio de un papel filtro y está listo para ser utilizado inmediatamente; en algunas ocasiones si el volumen del eyaculado es muy pobre se recomienda agregar algún diluyente comercial hasta completar un volumen de 40 – 60 ml. Es importante que cuando se vaya a inseminar una yegua con semen fresco se introduzcan al menos 40 ml, ya sea del puro eyaculado o agregándole un diluyente, ya que es la cantidad que se necesita para inundar completamente la capacidad uterina de la yegua con el fin de aumentar las probabilidades de que se lleve a cabo la fecundación.

2.6.2 Semen refrigerado

Es aquel que se ha obtenido de la colección del semental, se le retira la fracción gelatinosa y posteriormente se le añade un diluyente para proteger a los espermatozoides durante el proceso de refrigeración, de tal manera que pueda conservarse a una temperatura de entre 4 y 5 °C para

ser enviado y utilizado en las próximas 24 a 48 horas post refrigeración. Algunos autores reportan que la temperatura óptima de conservación de los espermatozoides por medio de la refrigeración es entre 5 – 8 °C (Boeta *et al.*, 2017), mientras que Serres y Álvarez, (2006) mencionan que la temperatura adecuada de enfriamiento varía entre 4 – 6 °C.

2.6.3 Semen congelado (criopreservación)

Este tipo de semen sufre de un proceso llamado “criopreservación”. Este proceso consiste en que una vez que se ha retirado la fracción gelatinosa, se le agrega un extender para diluir la muestra y posteriormente centrifugarlo a 400 – 600 gravedades por un lapso de tiempo de 15 minutos. Transcurrido ese tiempo se retira todo el plasma seminal y el extender con una jeringa, dejando únicamente los espermatozoides para luego agregarle un criopreservador que será de ayuda para proteger a los espermatozoides de los choques térmicos por enfriamiento y congelamiento. Posteriormente el semen es empajillado en pajillas de 0.5 ml y sellado a presión. En seguida las pajillas se deben de enfriar a 4-5 °C por 20 minutos antes de ser congeladas para disminuir los riesgos por shocks térmicos. Luego, el semen pasa por otro proceso de enfriamiento a base de vapor de nitrógeno durante 20 minutos, ya por último se sumerge en el nitrógeno para ser congelado. De esta manera el semen está listo para ser utilizado en los próximos días, meses o incluso años después de la congelación.

2.7 Diluyentes

Un diluyente se considera aquella solución acuosa que permite aumentar el volumen del eyaculado preservando las características funcionales de los espermatozoides manteniendo un nivel de fertilidad adecuado (Valencia, 2006). Los diluyentes de semen contienen componentes protectores que permiten la sobrevivencia espermática fuera de tracto reproductivo. Además de esto aumentan el volumen de la dosis inseminante. Yema de huevo, leche y glicerol son los componentes más adicionados para la protección de los espermatozoides frente al descenso de temperatura. Las lipoproteínas presentes en la leche y la yema de huevo protegen a los espermatozoides del choque térmico. Substratos metabolizables como glucosa constituyen la fuente de energía para las células espermáticas. Los diluyentes deben contener sustancias con

alta capacidad tampón para neutralizarlos. Los antibióticos son adicionados en forma rutinaria a los diluyentes para retardar o eliminar el crecimiento de bacterias que invariablemente contaminan el semen como consecuencia de la recolección. (Brinsko y Varner, 1993). Los antibióticos más empleados son la penicilina G-potásica o sódica cristalina, la gentamicina o amikacina, la estreptomina o penicilina G-potásica cristalina. La combinación de penicilina G-potásica cristalina con amikacina fue más eficaz en el control de bacterias anaerobias. (Brinsko y Varner, 1993).

2.7.1 BotuSemen[®] GOLD

Recientemente, se introdujo en el mercado un nuevo extensor de enfriamiento de semen que contiene caseinato de sodio en combinación con ciclodextrina cargada de colesterol (BotuSemen[®] GOLD). Las caseínas son proteínas de la leche que presumiblemente pueden prevenir el daño criogénico de los espermatozoides al unirse competitivamente a las proteínas del plasma seminal involucradas en este proceso (Manjunath, 2012; Plante *et al.*, 2015). Las caseínas también interactúan con el calcio ionizado, que desempeña un papel fundamental en la fosforilación de tirosina durante la capacitación de los espermatozoides (Pagl *et al.*, 2006; Coutinho *et al.*, 2012) La ciclodextrina funciona como transportador para incorporar colesterol en la membrana plasmática, lo que presumiblemente mejora la supervivencia de los espermatozoides durante el enfriamiento (Hartwig *et al.*, 2014; Klein *et al.*, 1995). BotuSemen[®] GOLD contiene caseínas, azúcares, aminoácidos, antioxidantes, colesterol y sustancias complementarias (Rečková *et al.*, 2022).

2.7.2 INRA 96®

Este diluyente se basa en sales de Hanks modificadas, complementadas con fosfocaseinato nativo (Batellier *et al.*, 2001). El fosfocaseinato nativo es un componente de la leche que consta de caseínas α , β y κ (Batellier *et al.*, 1997) y muestra un efecto protector directo sobre los espermatozoides de los sementales (Batellier *et al.*, 2000). INRA 96® ha sido el diluyente superior y más utilizado durante mucho tiempo (LeFrappier *et al.*, 2010; Novello *et al.*, 2020). INRA 96® contiene caseínas, buffers, sales, azúcares, agua ultrapura y antibióticos (penicilina sódica, sulfato de gentamicina y anfotericina B). La composición química exacta de los diluyentes es un secreto comercial de los productores (Rečková *et al.*, 2022).

Una preocupación con INRA 96® es que la concentración de antibióticos presente puede ser insuficiente para prevenir el crecimiento excesivo de bacterias durante el enfriamiento (Ramires *et al.*, 2015). *Pseudomonas aeruginosa* en particular, una causa altamente contagiosa de endometritis crónica en yeguas, no puede ser inhibida; por lo tanto, se convirtió en un estándar de la industria incluir ticarcilina con ácido clavulánico, un betalactámico anti-*Pseudomonas* (Dean *et al.*, 2012).

2.8 Criopreservadores

En los últimos años se han introducido en la industria equina mejoras a la criopreservación de espermatozoides, las cuales han facilitado el comercio nacional e internacional del semen equino. Este proceso, adicionalmente, ayuda al control de la diseminación de enfermedades venéreas y, permite a su vez, la inseminación de varias yeguas con un solo eyaculado (Peña *et al.*, 2011). No obstante, la calidad del semen descongelado es inferior respecto al semen fresco o refrigerado, lo cual queda demostrado por la disminución de la tasa de preñez (Hoffmann *et al.*, 2011). Esto sucede por los cambios que sufre la célula espermática durante el proceso de congelación, que conllevan a la pérdida de la integridad y de la función de la membrana plasmática (Parks y Graham, 1992), atribuido al choque térmico, al estrés osmótico, al estrés oxidativo, a la formación de cristales de hielo y a la apoptosis (Peña *et al.*, 2011). Algunos diluyentes comerciales se destacan por su amplio uso para la criopreservación del semen equino,

así como por las múltiples investigaciones realizadas para determinar su efectividad, como es el caso de los denominados INRA 82[®] e INRA 96[®], formulados con componentes como sales de Hanks, glucosa, lactosa, rafinosa, fosfocaseína, citrato sódico, citrato potásico y leche desnatada, y suplementados comúnmente para congelación con yema de huevo y glicerol (Janett *et al.*, 2012; Fayrer-Hosken *et al.*, 2008).

Los crioprotectores son sustancias hidrosolubles que disminuyen el punto eutéctico de la solución a la que se incorporan. El punto eutéctico es la temperatura más baja a la cual se puede fundir una mezcla de solutos con una composición fija. La disminución del mismo permite una mayor deshidratación de la célula espermática disminuyendo el gradiente osmótico al que dicha célula es sometido, es decir, se alcanza la misma concentración de solutos a una temperatura menor, por lo que la célula queda más protegida (Fabbri *et al.*, 1998).

2.8.1 BotuCRIO[®]

El BotuCRIO[®] de Botupharma es un medio diluyente para congelación de semen equino que combina glicerol-metilformamida como crioprotector y 20 aminoácidos diferentes en el diluyente base. La evaluación *in vitro* de semen congelado en BotuCRIO[®], sugiere que los parámetros de la motilidad se incrementan en comparación con semen descongelado procesado en los diluyentes que contienen glicerol como único crioprotector. (Samper y García, 2008). El diluyente BotuCRIO[®] está compuesto por agua ultrapura, aminoácidos, carbohidratos, glicerol, amidas, gentamicina, penicilina y yema de huevo (Morillo *et al.*, 2011; Morillo *et al.*, 2012).

2.8.2 Dimetilformamida (DMF)

La dimetilformamida es un crioprotector de creciente uso en la criopreservación del semen equino, se considera un crioprotector penetrante a nivel celular y de bajo peso molecular. Actualmente se sugiere que el crioprotector ideal debería ser aquel con bajo peso molecular, gran solubilidad en el agua y una mínima toxicidad. Debido a que la mayoría de las amidas tienen un bajo peso molecular, comparadas con el glicerol, estos crioprotectores pueden inducir un daño osmótico menor (Pérez, 2015). El uso de dimetilformamida como crioprotector en

diluyentes de congelamiento para semen equino, ha proporcionado un aumento en la motilidad en el descongelamiento y una preservación de la integridad de la membrana celular mayor que el glicerol (Vidament *et al.*, 2002; Mesa y Henao, 2012), ofreciendo una alternativa para mejorar la respuesta del patrón de motilidad e integridad celular para aquellos reproductores que congelan pobremente cuando se usa el glicerol (Alvarenga *et al.*, 2005).

Esta tecnología permite una máxima distribución y una adecuada disponibilidad de material germinal de ejemplares de interés mediante su conservación a largo plazo (Loomis y Graham, 2008), lo cual favorece el mejoramiento genético para rasgos de valor comercial en la especie, a través de la selección y de los cruzamientos dirigidos. Para la especie equina es aún limitado el uso de semen criopreservado, debido a una considerable reducción posdescongelación de su capacidad fecundante respecto al semen fresco (Ball, 2008). Adicionalmente, existe una gran variabilidad en los resultados obtenidos entre muchos ejemplares y razas equinas (Stornelli *et al.*, 2005).

2.9 EquiPure™

EquiPure™ es un producto de gradiente de densidad diseñado para aumentar la calidad y la viabilidad del esperma equino. Esto se logra separando los espermatozoides por centrifugación de densidad antes de la inseminación, congelación, FIV o sexado del semen. EquiPure™ no solo elimina una alta proporción de espermatozoides anormales, sino que también elimina la fuente de especies reactivas de oxígeno, la mayoría de las bacterias y muchos virus (EAV). Esto aumenta significativamente la supervivencia de los espermatozoides y su potencial de fertilización (ARBiotech, 2022). Además de su función como medio de selección de espermatozoides, la centrifugación mediante gradientes (EquiPure™) ha demostrado ser también efectiva a la hora de eliminar agentes patógenos del semen (Johannisson *et al.*, 2009; Morrell, 2009).

Previos estudios en espermatozoides descongelados de equino, han demostrado que el EquiPure™ (Stoll *et al.*, 2012) y el procedimiento de Swim-up (Sieme *et al.*, 2003), permiten la separación de espermatozoides con morfología normal y alta motilidad.

Descripción de EquiPure™

- Una solución de sal isotónica.
- Las botellas sin abrir tienen una vida útil de 12 meses.
- pH de 7.25 – 7.35 a temperatura ambiente y a 37 °C.
- Esterilizado por filtración.
- Contenido probado solo por supervivencia de espermatozoides.
- El embalaje está compuesto por botellas de vidrio de borosilicato, tapones de silicona y sellos a prueba de manipulaciones.
- Las botellas y los tapones han sido probados por MEA (ARBiotech, 2022).

2.10 Sistemas de análisis de semen asistido por computador (CASA)

El análisis de semen asistido por computador (CASA) ha permitido una medición objetiva de muchos parámetros de la movilidad y la morfología de semen, ofreciendo mediciones más confiables, imparciales y repetibles, respecto al examen visual (Magistrini *et al.*, 1996; Colenbrander *et al.*, 2003; Graham y Mocé, 2005). Mediante sistemas CASA, se ha encontrado una mayor asociación entre la movilidad y la fertilidad, medida a través de parámetros, como la tasa de preñez estacional, el porcentaje de preñez por ciclo y el porcentaje de preñez al primer ciclo (Love, 2011). La aplicación práctica del sistema CASA, como parte del mejoramiento en la calidad de los análisis del semen del caballo, se ha visto limitada por aspectos, como la carencia de valores estándar definidos, para lo que es normal y anormal en el movimiento del espermatozoide, al uso de referentes seleccionados sin criterios estadísticos y por la falta de implementación de una reglamentación internacional, para los ajustes del equipo (Katila, 2001; Quintero *et al.*, 2003; Hoogewijs *et al.*, 2011).

2.10.1 Sperm Class Analyzer® (SCA)

Un sistema reciente es el SCA® (Sperm Class Analyzer) comparado en la evaluación de semen humano, con el sistema IVOS® y con la evaluación convencional manual no computarizada, encontrando resultados equiparables (Proctor *et al.*, 2009). El sistema SCA® ha sido

previamente empleado para la evaluación de semen equino (Hidalgo *et al.*, 2005; Mesa y Henao, 2012). Pertenece a la generación de los sistemas de análisis de semen tipo CASA, integrado por los siguientes componentes:

- Hardware: ordenador, cámara digital Basler (VisionTechnology) 312 FC/C, 25 imágenes/s, microscopio Nikon B-200 con platina termostatazada, placa calefactora Omron (Aulesa *et al.*, 2009).
- Software: SCA[®]. Es un programa informático compuesto por los siguientes módulos: Módulo de movilidad y concentración: es el módulo para analizar la movilidad y la concentración espermática que se realiza utilizando las cámaras desechables de Leja, aconsejadas por el fabricante del analizador y utilizadas por varios autores (Douglas-Hamilton *et al.*, 2005; Bailey *et al.*, 2007; Tomlinson *et al.*, 2001). Este módulo necesita disponer de un microscopio que incorpore una platina termostatazada a 37 °C para efectuar las mediciones. Módulo de morfología: es el módulo que analiza la morfología y morfometría de los espermatozoides. Otros módulos: módulo de control base de datos e informes, módulo de concentración OMS, módulo de fragmentación de ADN, módulo contador (Aulesa *et al.*, 2009).

2.10.2 iSperm mCASA

iSperm es el primer analizador de semen automatizado portátil (mCASA). Ofrece lecturas, videos y cálculos necesarios para una evaluación completa fundamentado en datos, para facilitar la evaluación de los veterinarios y productores en la práctica diaria. Capaz de analizar la calidad del semen de diferentes especies, ofreciendo una configuración flexible, que se adapta a animales productivos, de compañía y en peligro de extinción (iSperm, 2022). El iSperm está compuesto de un iPad mini de Apple que lleva integrada una lente óptica optimizada, y permite el examen microscópico con una resolución óptica excepcional. El software calcula la concentración de espermatozoides y su motilidad e informa del número de las dosis a realizar con el eyaculado (Humeco, 2022).

Ventajas del iSperm

- Los resultados se muestran tras 10 segundos de análisis y grabación de video de 7 segundos. El algoritmo de procesamiento de imágenes analiza automáticamente la concentración y motilidad.
- Las muestras se colocan en un chip o cápsula (consumibles para el análisis).
- Esta cápsula consta de un preciso sistema microfluídico para la correcta cuantificación de la concentración espermática.
- Peso de 50 g, incluyendo la batería.
- La cámara con fotos 5MP y grabación de 1080p Full HD.
- Además, se puede hacer zoom en la pantalla y observar las morfo anomalías espermáticas a gran aumento en la muestra viva o teñida.
- Multiespecie (Humeco, 2022).

III MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización del sitio experimental

El presente estudio de investigación se realizó en el Rancho Santa Cecilia ubicado en Ciudad Victoria, Tamaulipas, cabecera del municipio de Victoria. Se localiza al noreste de México, en la parte centro del estado al pie de la Sierra Madre Oriental, entre coordenadas 23° 42' 22'' latitud norte y 99° 06' 24'' longitud oeste, con una altitud de 313 msnm. El rancho está enfocado al área de reproducción, producción, arrendamiento y venta de potros cuarto de milla con fines de producir caballos de rienda charra para competencias nacionales en el deporte de la charrería.

3.2 Materiales para la colecta de semen

- Sementales
- Yeguas
- Domi o potro
- Agua purificada
- Toallas de secado
- Termo eléctrico
- Termómetro digital
- Guantes desechables
- Gel lubricante no espermicida
- Vagina artificial modelo Missouri
- Vagina artificial modelo Colorado
- Vaso colector de semen
- Liners desechables transparentes

3.3 Materiales para la evaluación de semen

➤ **Fresco**

- Filtros para semen de celulosa
- Tubos falcon graduados de 15 y 50 ml
- iSperm
- BotuSemen® GOLD
- Termo eléctrico
- Termómetro digital

➤ **Refrigerado**

- Filtros para semen de celulosa
- Tubos falcon graduados de 15 y 50 ml
- iSperm
- BotuSemen® GOLD
- Refrigerador
- Termómetro digital

➤ **Congelado**

- Filtros para semen de celulosa
- Tubos falcon graduados de 15 y 50 ml
- iSperm

3.4 Materiales para el procesamiento de semen

- Tubos falcon graduados de 50 ml
- BotuSemen[®] GOLD
- EquiPure[™]
- Centrífuga
- Jeringa de 10 ml y aguja
- BotuCRIO[®]
- Pajillas de 0.5 ml
- Balines metálicos
- Refrigerador
- Nitrógeno líquido (-196 °C)
- Hielera
- Gradilla
- Termo eléctrico
- Termómetro digital
- Pinzas
- Tijeras
- Cronómetro
- iSperm

3.5 Descripción de los tratamientos

Para este estudio de investigación se desarrolló una serie de tratamientos que fueron sometidos a la experimentación de campo para la obtención de datos estadísticos, los cuales fueron evaluados en base al comportamiento de los espermatozoides equinos de tres caballos ¼ de milla a diferentes temperaturas: semen fresco a 37 °C y 26 °C y semen refrigerado a 5 °C. Esto se llevó a cabo con la intención de hacer una evaluación cualitativa y cuantitativamente del semen equino con fines de experimentación a nivel de campo y laboratorio para determinar principalmente el grado de motilidad de los espermatozoides expuestos en distintas circunstancias de temperatura.

Para la evaluación del semen se emplearon las modalidades en fresco (37 y 26 °C) y refrigerado (5 °C) por un periodo de 24 horas con la adición del diluyente BotuSemen® GOLD, además se realizó un estudio observativo sobre el comportamiento de los espermatozoides post descongelación donde se analizó la respuesta de los espermatozoides con la adición de algunos coloides. Las colectas que se realizaron estuvieron comprendidas entre los meses de septiembre, octubre y noviembre.

3.5.1 Factores sobre los tratamientos

- **Tiempo:** El tiempo se evaluó para determinar el efecto que éste tiene en la motilidad de los espermatozoides, de manera que se contempló la hora a la que se presentaba mayor y menor porcentaje de motilidad.
- **Temperatura:** Para evaluar el efecto de la temperatura se observó el comportamiento de los espermatozoides en los tres escenarios, 37, 26 y 5 °C, y se determinó en cuál de los tres hubo mayor porcentaje de motilidad constante, es decir, que se estabilizara por más tiempo.

- **Diluyente:** El diluyente empleado (BotuSemen® GOLD) fue evaluado en comparación con el tratamiento testigo para determinar el grado de efecto positivo o negativo que éste tiene sobre la motilidad espermática.

3.5.2 Modalidad en fresco

De acuerdo al proceso que se llevó a cabo en el Rancho Santa Cecilia para la colecta y evaluación del semen, se siguió una serie de pasos y protocolos preestablecidos para que el experimento se hiciera lo más adecuado y limpio posible con la intención de no contaminar el eyaculado y generar falsos resultados.

- i. Como punto importante antes de realizar la colecta de semen se hizo una previa selección de los posibles ejemplares aptos para ser colectados, principalmente que tuvieran una buena libido y que estuvieran entrenados para la colecta.
- ii. Posteriormente se seleccionó a la yegua, la cual de preferencia era una que estuviera ciclando para poder recelar al semental por medio de las feromonas que son liberadas por la yegua.
- iii. Una vez hecho la selección de ambos ejemplares se pasó a recelar al semental. Para este paso se necesitaron dos personas capacitadas, una para manejar a la yegua y otra para el caballo. Siempre es recomendable que haya una barrera entre yegua y caballo para evitar algún golpe, en este caso se utilizó el domi como barrera. Enseguida se comenzó a recelar al semental estimulándolo sexualmente por medio de las feromonas liberadas por la yegua en celo, las cuales son percibidas por el macho al exponer el órgano vomeronasal (reflejo de Flehmen).
- iv. Luego se procedió a lavar el pene del caballo (Figura 1) solo con agua tibia (37 °C) para eliminar la tierra, polvo, el esmegma y cualquier otro tipo de suciedad que pueda contaminar el eyaculado. Cabe mencionar que el lavado se debe hacer desde la base del pene hasta la punta del glande, y sobre todo en el meato urinario, ya que ahí se suele

acumular mucha suciedad. Posterior a esto el pene se secó con una toalla desechable (este paso es muy importante ya que el agua es espermicida, por lo que se pretende que el pene quede totalmente seco).

- v. Las vaginas artificiales que se utilizaron fueron dos, la Missouri y la Colorado. Ambas vaginas llevan el mismo proceso de preparación, para ello, se calentó agua en el termo eléctrico y con ayuda del termómetro digital se verificó que la temperatura estuviera entre 50 – 55 °C. Es importante saber que no todos los caballos eyaculan a la misma temperatura, por lo que en varias ocasiones se tuvieron que hacer ajustes en la temperatura del agua. Además, para que la vagina tenga cierta presión en su interior se le agrega una determinada cantidad de aire soplando por la válvula de entrada.
- vi. Posterior a ello se lubricó el interior de la vagina utilizando un guante desechable con gel para que a la hora de la colecta el pene pueda penetrarla con mayor facilidad.
- vii. Ya que el caballo estaba a punto de subirse al domi se retiró a la yegua y otra persona procedió a introducir la vagina artificial en el pene del semental para realizar la colecta (Figura 2). Aquí es importante observar la cola del semental, ya que cuando termina de eyacular suele hacer un banderilleo con su cola, lo cual indica que ha terminado.
- viii. Después el eyaculado fue trasladado al laboratorio donde se hizo la evaluación. Con ayuda de un tubo graduado y un papel de celulosa el eyaculado se filtró para eliminar la porción de gel y los posibles agentes extraños.
- ix. Pasando a lo siguiente se observó el volumen real y se tomó una muestra de semen para analizarlo en el iSperm, obteniendo los datos de la concentración y motilidad del semen.
- x. Posteriormente se comenzó a fraccionar el eyaculado en tubos falcon de 15 ml para generar los diferentes tratamientos, de tal manera que de un eyaculado se fraccionó en

dos, uno para evaluarlo a 37 °C y otro a temperatura ambiente de 26 °C. De estas dos fracciones nuevamente se dividieron en otras dos cada una para formar dos tratamientos a 37 °C y dos a 26 °C.

- xi. El experimento consistió en evaluar el comportamiento de los espermatozoides en cuatro tratamientos (Cuadro 1) en base al porcentaje de motilidad a través del tiempo (0, 3, 6, 12, 18, 24 hrs) con la aplicación del extender BotuSemen[®] GOLD de Botupharma, de tal manera que dicho extender se aplicó a diferentes horas para observar la respuesta de los espermatozoides.
- xii. Para los tratamientos que fueron evaluados a 37 °C, se utilizó un termo eléctrico y un termómetro digital para atemperar el agua a dicha temperatura, ya que para cada tratamiento se utilizó un tubo falcon de 15 ml y fueron introducidos en el termo con agua, considerando siempre mantener una temperatura de 37 °C.
- xiii. El T1 representó el testigo, de manera que en base a éste se hicieron las comparaciones correspondientes de motilidad con los demás tratamientos, el cual se trató en tomar una muestra del eyaculado para ser atemperado en las condiciones ya mencionadas anteriormente sin ninguna aplicación de extender. El T2 consistió en aplicarle una dosis de BotuSemen[®] GOLD al semen con una relación de 1:1 a la hora cero. En el caso del T3, éste se derivó del T1, es decir, a la hora tres el T1 se fraccionó en dos para generar el T3 y a esa hora se le aplicó una dosis de BotuSemen[®] GOLD 1:1. Por último, el T4 se derivó del T2, de tal manera que a la hora tres el T2 se fraccionó en dos para generar el T4, por lo que éste último tuvo una segunda aplicación de BotuSemen[®] GOLD a la hora tres con una relación 1:1.
- xiv. Con ayuda del analizador de semen iSperm se tomó una muestra de cada tratamiento y se evaluaron los porcentajes de motilidad a las 0, 3, 6, 12, 18 y 24 horas, registrando todos los datos para comparar los tratamientos.

- xv. En el caso de los tratamientos que fueron evaluados a temperatura ambiente a 26 °C, la metodología fue exactamente la misma a la descrita anteriormente, a diferencia de que éstos no fueron atemperados en el termo eléctrico, sino que se dejaron a la intemperie dentro de las instalaciones del laboratorio de trabajo.

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos para la modalidad en fresco a 37 y 26 °C.

Tratamientos	Descripción
T1	Semen testigo
T2	Semen + BotuSemen [®] GOLD (a la hora cero)
T3	T1 + BotuSemen [®] GOLD (a la hora tres)
T4	T2 + BotuSemen [®] GOLD (a la hora cero y a la hora tres)



Figura 1. Lavado del pene del caballo antes de la colecta.



Figura 2. Colecta de semen con vagina artificial tipo Colorado.

3.5.3 Modalidad en refrigerado

Como se mencionó anteriormente, en esta modalidad se aplicaron los mismos cuatro tratamientos (Cuadro 2), pero con ciertas particularidades que lo diferencian.

- i. Una vez realizada la colecta se procedió a evaluar la motilidad espermática en el analizador iSperm para registrar el porcentaje de motilidad base, del cual partieron todos los tratamientos.
- ii. Posterior a ello, se fraccionó el eyaculado en tubos falcon de 15 ml para los tratamientos T1 y T2. Inmediatamente al T2 se le agregó BotuSemen[®] GOLD 1:1 y ambos se introdujeron en un refrigerador a una temperatura constante de 5 °C.

- iii. Transcurridos 30 minutos en refrigeración, las muestras de semen bajaron a la temperatura deseada, para ello se utilizó un termómetro digital para comprobar que la temperatura fuera de 5 °C.
- iv. Inmediatamente se comenzaron a evaluar los tratamientos con el iSperm, de tal manera que el primer registro de motilidad fue cuando las muestras de semen tenían una temperatura de 5 °C, siendo ésta la hora cero.
- v. Los tratamientos T3 y T4 se generaron a partir de la división de T1 y T2 respectivamente a la hora tres, por lo que al T3 y T4 se les aplicó la dosis de BotuSemen® GOLD 1:1 a esta misma hora.
- vi. El semen se continuó evaluando a las 3, 6, 12, 18 y 24 horas, estando en refrigeración en todo momento.

Cuadro 2. Descripción de los tratamientos para la modalidad en refrigerado a 5 °C.

Tratamientos	Descripción
T1	Semen testigo
T2	Semen + BotuSemen® GOLD (post colecta)
T3	T1 + BotuSemen® GOLD (a la hora tres)
T4	T2 + BotuSemen® GOLD (post colecta y a la hora tres)

3.5.4 Modalidad en congelado

Los tratamientos que se emplearon en esta modalidad fueron diferentes a los anteriores, en este caso estuvieron presentes siete tratamientos (Cuadro 3) los cuales tuvieron un procesamiento diferente para observar su comportamiento después de congelar – descongelar. Se recomienda, antes de iniciar el proceso de congelación, que el semen en fresco, mínimo, presente una morfología de espermatozoides normales por encima del 40 %, una motilidad progresiva mayor al 60 % y una concentración superior a 100 millones de espermatozoides por ml (Restrepo *et al.*, 2014; Fayrer-Hosken *et al.*, 2008), aunque si es necesario también se han desarrollado algunos protocolos especiales para procesar eyaculados de bajo volumen y concentración (Barrier-Battut, 2013).

Posterior a la colecta y filtrado del semen, con ayuda del iSperm se analizó la motilidad espermática inicial, es decir, antes de ser procesado y congelado, de tal manera que todos los tratamientos iniciaron con una motilidad base equivalente.

- i. Después el eyaculado se fraccionó en tubos falcon de 50 ml para cada tratamiento. El T1 representó el testigo al que no se le agregó ni se le procesó nada, solamente se tomó una muestra de semen y se envasó en una pajilla de 0.5 ml; los tratamientos 2 – 6 se centrifugaron a 1500 rpm durante un tiempo de 15 minutos. Para el T2 se tomó una muestra del eyaculado en el tubo falcon y se colocó en la centrífuga. En el T3 se hizo uso del producto EquiPure™ para centrifugar el eyaculado, debido a que es un producto de gradiente de densidad, este se agregó con ayuda de una jeringa y una aguja larga para llegar hasta el fondo del tubo falcon y suministrar la dosis de EquiPure™ (2.5 ml/10 ml de semen) lentamente, para después ponerlo en la centrífuga. Al T4 se le añadió una dosis de BotuSemen® GOLD antes de la centrifugación con una relación de 1:1, con la intención de aportar una fuente de alimento para los espermatozoides durante su procesamiento. Como anteriormente se mencionó en el T3, al T5 también se le añadió una dosis de EquiPure™ con las mismas especificaciones ya mencionadas, además de una aplicación de BotuSemen® GOLD para posteriormente colocarlo en la centrífuga. Mientras tanto, al T6 se le aplicó una dosis de BotuSemen® GOLD antes de

centrifugarlo para aportar alimento y energía. Por último, el T7 no tuvo un procesamiento como los anteriores, simplemente se tomó la muestra de semen y se le agregó una dosis de criopreservador BotuCRIO® y finalmente se empajilló.

- ii. Transcurridos los 15 minutos de centrifugación, con una jeringa se comenzó a retirar todo el plasma y las soluciones que fueron agregadas al semen de cada tratamiento, con el fin de dejar solamente la fracción de espermatozoides dentro de los tubos falcon.
- iii. Ya con los tubos falcon libres de soluciones se continuó a complementar la fracción de espermatozoides agregando una dosis de criopreservador BotuCRIO® (solo a los tratamientos que fueron procesados, es decir T2, T3, T4, T5 y T6).
- iv. Seguido de ello los tratamientos fueron envasados en pajillas de 0.5 ml para poder manipular cada muestra y seguir con el proceso de congelación.
- v. Ya que todos los tratamientos fueron envasados se prosiguió a sellar las pajillas con balines metálicos, los cuales se introdujeron a presión por un extremo de la pajilla.
- vi. Después se comenzó con el proceso de pre congelación, consistiendo en ir bajando la temperatura del semen gradualmente para evitar una mayor pérdida de espermatozoides por shock térmico. Para la refrigeración las pajillas fueron colocadas dentro de un refrigerador a una temperatura constante de 5 °C por 20 minutos.
- vii. Posteriormente, las pajillas se sacaron del refrigerador para seguir con otro proceso de enfriamiento a base de vapor de nitrógeno, para lo cual se dispuso de una hielera de poliestireno expandido (unicel) para verterle una cantidad determinada de nitrógeno líquido. Enseguida las pajillas se colocaron en una gradilla de metal y dicha gradilla se introdujo a la hielera a una altura de 5 cm del nivel del nitrógeno, con el fin de no hacer contacto con el líquido, sino que solamente fuera enfriado por el vapor. La hielera se cubrió con su respectiva tapa y se dejó enfriando las pajillas por 20 minutos.

- viii. Al transcurrir ese tiempo las pajillas ya se encuentran a una temperatura promedio de -120 °C, de manera que el último paso fue sumergir las pajillas en el nitrógeno a -196 °C, dejando pasar unos 15 segundos hasta que dejara de burbujear el N, ya que esto indica que se ha llegado a la temperatura final.
- ix. Por último, se pasó a hacer la descongelación de las pajillas para evaluar la motilidad final de los tratamientos, cabe mencionar que este paso es crítico para la célula espermática debido a las alteraciones que sufre en el proceso de congelar-descongelar (Figura 3). Para ello, con la ayuda de unas pinzas se retiraron las pajillas del nitrógeno y se introdujeron a un termo con agua atemperada a 37 °C durante 60 segundos. Luego con unas tijeras se cortaron las pajillas del extremo sellado para extraer una muestra de semen y analizar la motilidad espermática en el iSperm.

Cuadro 3. Descripción de los tratamientos para la modalidad en congelado.

Tratamientos	Descripción
T1	Semen testigo
T2	Semen + BotuCRIO®
T3	Semen + BotuCRIO® + EquiPure™
T4	Semen + BotuCRIO® + BotuSemen® GOLD
T5	Semen + BotuCRIO® + BotuSemen® GOLD + EquiPure™
T6	Semen + BotuCRIO® + BotuSemen® GOLD (2)
T7	Semen + BotuCRIO® (sin centrifugar)

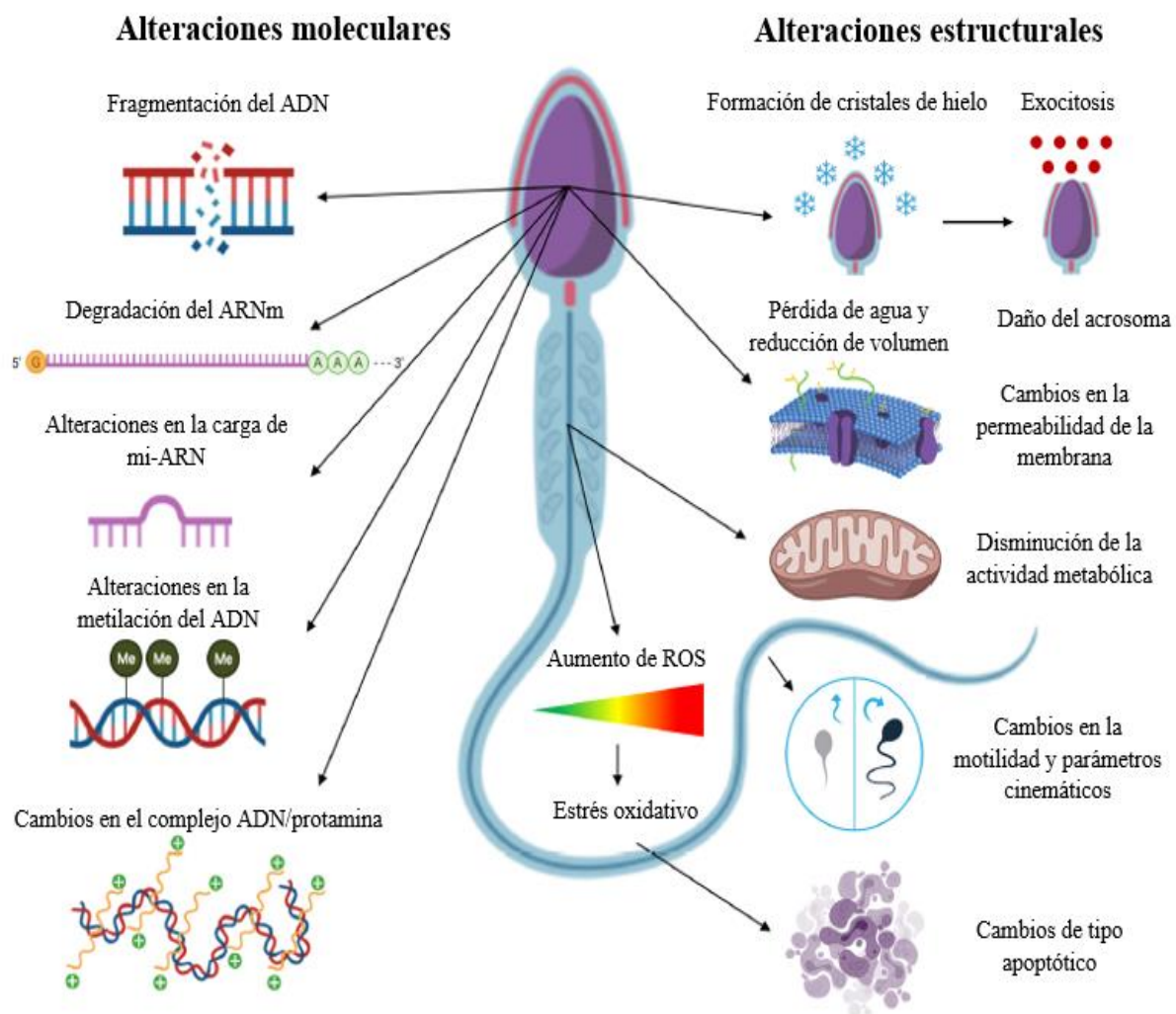


Figura 3. Alteraciones estructurales y moleculares en espermatozoides de mamíferos después de la criopreservación.

Tomada de Yáñez *et al.* (2021)

3.6 Variables a evaluar

3.6.1 Motilidad

La motilidad espermática se evaluó con un analizador de semen automatizado específicamente con el iSperm mCASA, para lo cual se tomó una gota de semen y se colocó en el chip o cápsula para posteriormente insertarlo en la cámara del analizador, y automáticamente los resultados se muestran en la pantalla en 10 segundos.

3.7 Análisis estadístico

Para comparar el efecto de la variable estudiada, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) mediante un diseño completamente al azar con tres repeticiones con un arreglo factorial A x B donde A = Temperatura y B = Diluyente. Los datos fueron analizados en el software estadístico R-project bajo la prueba Tukey con un margen de error ($p < 0.05$).

IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos, (Figura 4), se muestra el efecto que tuvo el factor tiempo (h) con respecto a la motilidad de los espermatozoides. Si bien, se observa que a la hora cero los tratamientos T2 y T4 son los que registran un mayor porcentaje de motilidad, ambos con un valor de 32 % a diferencia de los tratamientos T1 y T3 con valores de 15 %. Posteriormente, al transcurrir el tiempo de la hora cero a la hora tres en todos los tratamientos se observó un descenso de la motilidad a excepción del T2 el cual tuvo un incremento del 1 %. Los porcentajes más bajos se registraron a la hora 24 en todos los tratamientos alcanzando valores de: **T1** = 0 %, **T2** = 9 %, **T3** = 1 % y **T4** = 7 %.

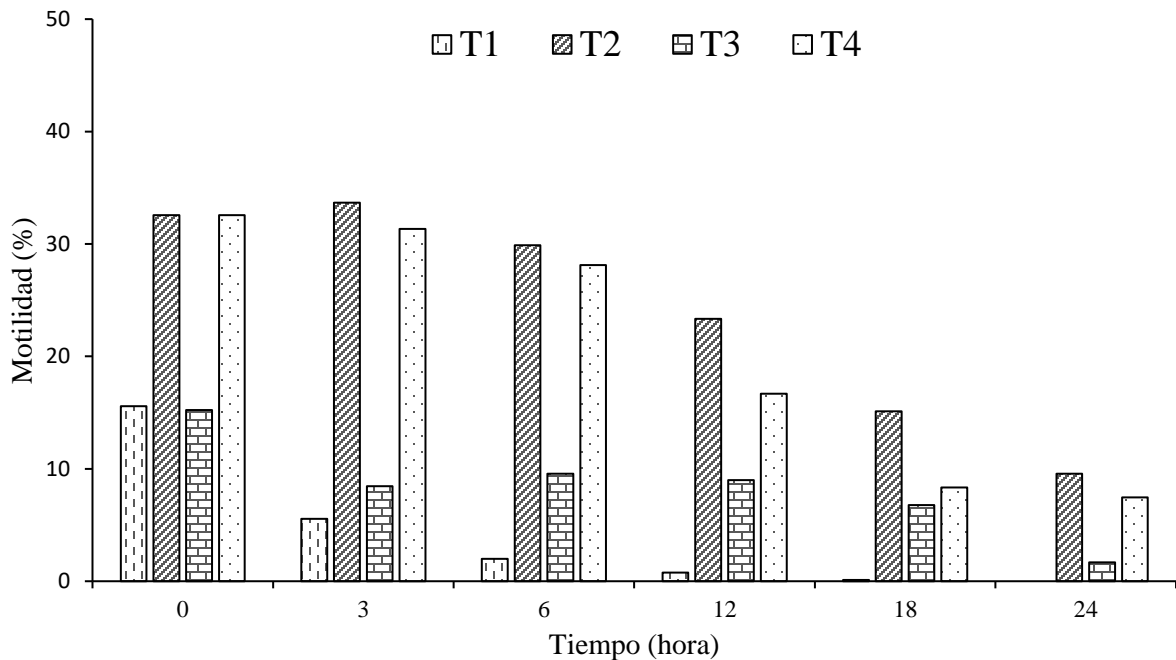


Figura 4. Efecto del tiempo y el diluyente (BotuSemen[®] GOLD) sobre la motilidad espermática en equinos.

Con estos valores se puede observar que el mejor tratamiento es el T2 a la hora tres, registrando el valor más alto con 33 % de motilidad, se atribuye a que el T2 tiene una aplicación de BotuSemen[®] GOLD desde la hora cero por lo que desde un principio se le aportan los nutrientes y medios necesarios para que los espermatozoides tengan una fuente de alimento y energía

suficiente. De manera general se observó que el mejor tratamiento con los más altos porcentajes de motilidad fue el T2, seguido por el T4, T3 y el de menor registro en porcentaje fue el T1.

Novello *et al.* (2020) realizaron un estudio con semen de caballos de distintas razas, entre ellas el ¼ de milla donde se evaluó la motilidad a las 24 horas en refrigeración con el diluyente BotuSemen® GOLD, y obtuvieron valores entre 70 - 80 % de motilidad. Estos datos difieren a los obtenidos en el presente estudio principalmente por los bajos porcentajes de motilidad iniciales. Por otra parte, Rečková *et al.* (2022) reportan valores de motilidad de entre 80 y 90 % a las 24 horas con semen refrigerado empleando el diluyente BotuSemen® GOLD. A diferencia de los datos reportados en este estudio cabe mencionar que la temporada en la que se hicieron las colectas de semen fue otoño – invierno, lo que pudo afectar en los porcentajes de motilidad iniciales.

Si bien, como se observó anteriormente el factor tiempo tuvo un efecto negativo en la motilidad de los tratamientos, es decir, conforme avanza el tiempo (horas) va disminuyendo la motilidad espermática. Otro factor que se evaluó fue el efecto que se tiene al aplicar diferentes temperaturas a los tratamientos (Figura 5). Se observa que a la temperatura de 37 °C el valor más alto que se registró fue de 14 % en el T4 y la más baja fue de 4 % en el T1. Con una temperatura de 26 °C se registró el mayor porcentaje de motilidad en el T2 con 26 % de motilidad y en el T1 el valor más bajo con 4 %. Al bajar la temperatura a 5 °C se registró el porcentaje más alto con un valor de 33 % en el T2 y el más bajo en el T1 con solo 3 % de motilidad. El mejor tratamiento fue el T2 a una temperatura de 5 °C con un valor de 33 %, esto se debe a que al disminuir la temperatura el metabolismo de los espermatozoides se vuelve más lento, lo que se interpreta en un menor gasto de energía, por esta razón se logra obtener un mayor porcentaje de motilidad a diferencia con 26 y 37 °C. El T2 a 26 °C registró una motilidad de 26 % y en el tercer puesto el T4 a 26 °C con una motilidad de 24 %. A grandes rasgos se observa que el T1 registró los valores más bajos en las tres diferentes temperaturas, lo cual indica que al no tener ninguna aplicación de algún diluyente, éste se ve mayormente afectado por los cambios de temperatura. Caso contrario ocurrió en el T2, ya que éste al tener una aplicación de BotuSemen® GOLD prolonga la motilidad espermática, incluso la mejora y protege a los espermatozoides de los cambios de temperatura.

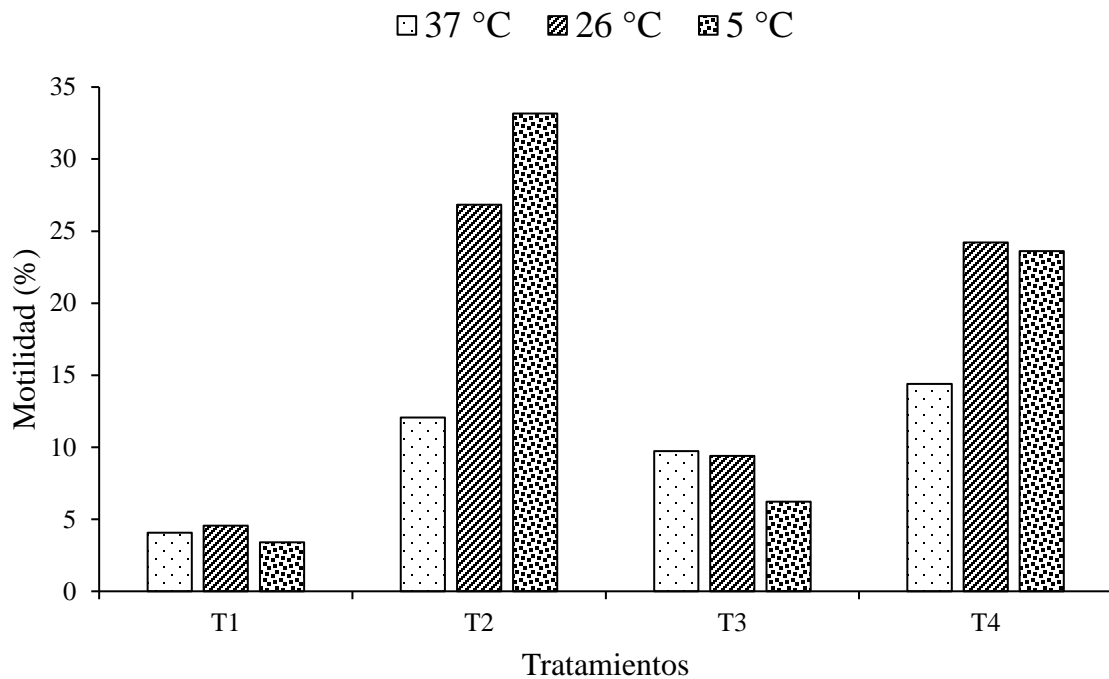


Figura 5. Efecto de la temperatura y el diluyente (BotuSemen® GOLD) sobre la motilidad espermática en equinos.

Giraldo *et al.* (2006) reportan valores de motilidad espermática con semen refrigerado a las 24 horas de 91.6 % en caballos de raza Criollo Colombiano utilizando el diluyente Kenney, cuyos datos estuvieron por encima a los que se obtuvieron en este estudio, ya que principalmente las motilidades iniciales reportadas en esta investigación eran relativamente bajas, cosa a la cual se le puede atribuir este caso.

De acuerdo al estudio de comportamiento de la motilidad que se realizó con semen criopreservado, se muestran los resultados obtenidos (Figura 6). Se observó que en todos los tratamientos hubo una pérdida de la motilidad con respecto a la inicial (88 %), además es evidente que el tratamiento que mostró mejor comportamiento fue el T5 con un porcentaje de 65 %, seguido por el T3 con un valor de 60 % de motilidad final y el T4 en la tercera posición con un porcentaje de 40 %. Es importante mencionar que el T3 y T5 fueron los únicos tratamientos a los que se les aplicó una dosis de EquiPure™, lo que indica que el uso de este producto de gradiente de densidad tiene un gran efecto en la criopreservación del semen equino,

teniendo pérdidas de motilidad de 32 % para el T3 y de 27 % para el T5 con respecto a la motilidad inicial. Caso contrario sucede con los tratamientos T2, T4 y T6 a los que no se les agregó el producto EquiPure™ y se observó que estos tratamientos perdieron más del 50 % de su motilidad inicial, registrando pérdidas de 74 % para el T2, 55 % para el T4 y 62 % para el T6. Los tratamientos que no fueron procesados antes de ser congelados (T1 y T7) mostraron el peor comportamiento de motilidad al ser descongelados dando como resultados de motilidad muy bajos en comparación con los tratamientos anteriores, ya que el T1 tuvo una pérdida de motilidad del 100 % y el T7 de 93 % con respecto a la motilidad inicial.

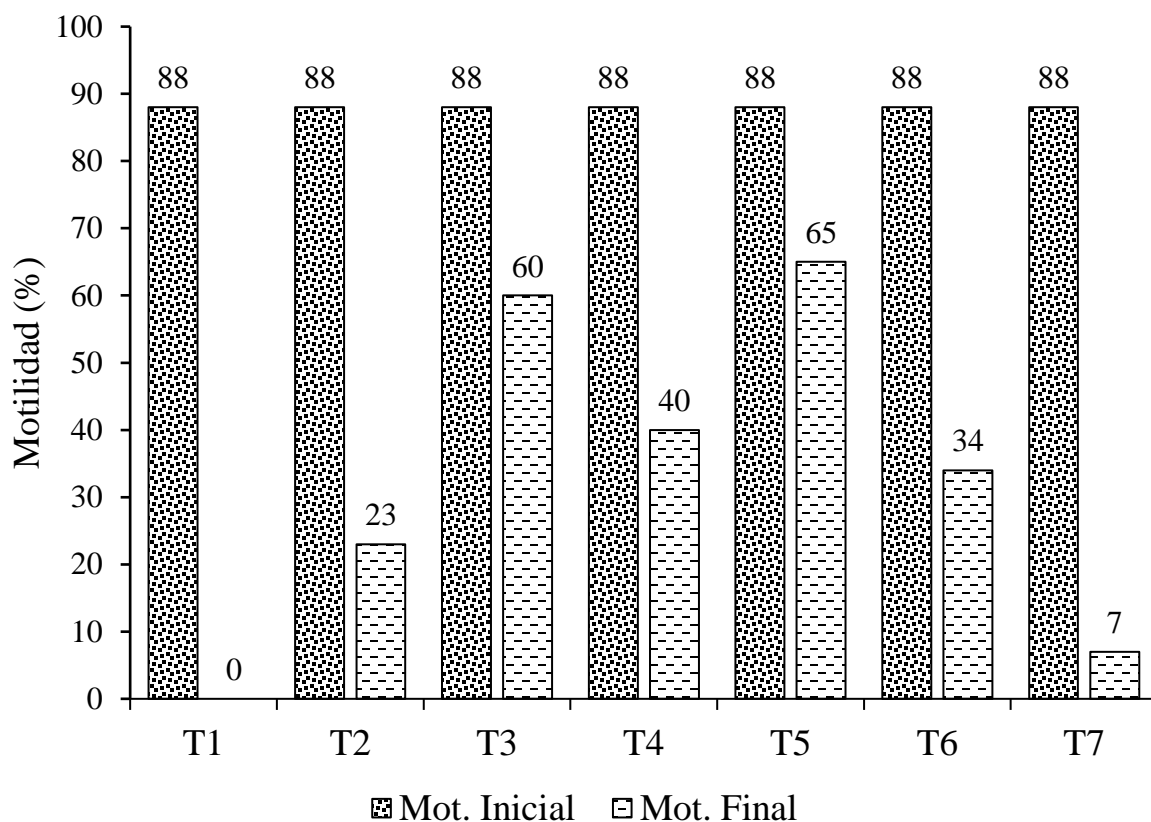


Figura 6. Motilidad del semen equino criopreservado con el diluyente (BotuSemen® GOLD) y con EquiPure™.

En Colombia, Mesa y Henao, (2012) emplearon el diluyente Kenney modificado (45 % de sacarosa, 29 % de glucosa y 26 % de leche descremada) más la adición de colesterol y ciclodextrina (1.5 mg con colesterol por cada 120×10^6 espermatozoides), como modificador de membrana, en caballos criollos; encontrando motilidad post descongelación de 30 %, mientras que cuando al diluyente Kenney modificado se le adicionó glicerol al 5 %, la motilidad fue de 20 %. Estos datos son similares a los obtenidos en este estudio, específicamente con los tratamientos T2, T4 y T6, sin embargo, estos valores relativamente bajos son atribuidos a la concentración de glicerol que tienen los crioprotectores, como lo menciona Squires *et al.* (2004), el glicerol es un crioprotector que parece tener efectos tóxicos sobre el semen equino, induce desnaturalización de las proteínas, cambio en las interacciones de la actina (Hammerstedt y Graham, 1992), estrés osmótico; ya que penetra en menor velocidad comparado con otros crioprotectores; a nivel intracitoplasmático, provoca incremento de la viscosidad, alteración en la polimeración de la tubulina y de la asociación de los microtúbulos (Gilmore *et al.*, 1995). En otro estudio la motilidad espermática fue analizada mediante análisis asistido por computador, en la cual no se evidenciaron diferencias significativas con promedios de 41 % y 38 % entre los dos medios INRA 82[®] e INRA 96[®], respectivamente (Pillet *et al.*, 2008). El empleo de INRA 82[®] en semen de raza Hanoveriana logró una motilidad de 62.3 % (Sielhorst *et al.*, 2016), cuyo valor fue muy similar a los obtenidos en el T3 y T5 con valores de 60 % y 65 % respectivamente. Debido a que los diluyentes INRA 82[®] y BotuCRIO[®] tienen en común su composición a base de yema de huevo y glicerol, se le puede atribuir esta razón al obtener resultados muy parecidos en la motilidad espermática.

Otro estudio realizado por Avanzi *et al.* (2015), con mayor similitud al presente estudio en el cual se evaluó el semen de dos caballos, uno de raza Westfalen y otro Mangalarga Marchador, el cual, para fines de centrifugación, se utilizó un diluyente a base de leche descremada (BotuSemen[®] de Botupharma) y para la congelación, los espermatozoides se diluyeron con BotuCRIO[®], prácticamente se utilizaron los mismos productos en esta investigación. De acuerdo con los resultados que se obtuvieron se registraron motilidades espermáticas post descongelación de 77.3 % para el caballo Westfalen y 70.5 % para el caballo Mangalarga Marchador. Estos valores coinciden con los obtenidos en el T3 y T5 del presente estudio, en los cuales también se utilizó en este caso el diluyente BotuSemen[®] GOLD y BotuCRIO[®] para

congelar. Por su parte, Pérez, (2018) reporta valores del 80 % de motilidad espermática con semen congelado de caballo Criollo utilizando el diluyente BotuTurbo® y el criopreservante BotuCRIO®.

Crespo *et al.* (2013) realizaron un estudio en el que evaluaron la motilidad espermática utilizando el coloide EquiPure™ para la centrifugación del semen poniendo a prueba tres tratamientos, uno sin centrifugación, otro a centrifugación sin aplicar ningún coloide y el tercero a centrifugación aplicando el coloide EquiPure™. Al analizar los datos se observó que no hubo diferencia en la motilidad entre no centrifugado, centrifugado directo y centrifugado más coloide registrando valores de 56.6 %, 55.8 % y 53.8 % respectivamente, caso contrario a los datos obtenidos en este estudio, en los que si hubo diferencia entre tratamientos al aplicar EquiPure™ para la centrifugación.

V CONCLUSIONES

La adición del diluyente BotuSemen® GOLD al semen de caballo ¼ de milla y conservándolo a una temperatura de 5 °C, mejoró la motilidad espermática.

EquiPure™ mejoró el comportamiento postdescongelación del semen criopreservado en la raza ¼ de milla.

VI LITERATURA CITADA

- Alvarenga, M. A., Leão, K. M., Papa, F. O., Landim-Alvarenga, F. C., Medeiros, A. S. L. y Gomes, G. M. (2004).** The use of alternative cryoprotectors for freezing stallion semen. *Havemeyer Foundation Monograph Series*, 12, 74-76.
- Alvarenga, M. A., Papa, F., Landim-Alvarenga, F. y Medeiros, A. S. L. (2005).** Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. *Animal reproduction science*, 89(1-4), 105-113.
- Amann, R. (1985).** An Overview Of Frozen Equine Semen: Procedures for thawing and insemination of frozen equine spermatozoa; Colorado State University; United States of America; 125.
- Amann, R. P. y Graham, J. K. (1993).** Spermatozoal function En: *Equine Reproduction*. Ed. McKinnon, Febiger, Pennsylvania.
- Amann, R. y Graham, J. (1993).** Spermatozoal function. *Equine Reproduction*, 715-745.
- Amann, R. y Graham, J. (2011).** Spermatozoal function. *Equine Reproduction*, 1062-1064.
- Amann, R. P. y Pickett, B. W. (1987).** Principle of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *J Equine Vet Sci* 7: 145-173.
- Amann, R. P. (2008).** The cycle of the seminiferous epithelium in humans: a need to revisit? *J Androl*, 29 (5) p. 469-87.
- Andrade, S. F., Pérez, O. J., Oliveira, S. A. D., Vale, F. V. R., Marc, H., Chacón, J. L. y Arias, S. A. (2011).** Algunos aspectos de la eficiencia reproductiva correlacionados con el semental equino. *Rev Cienc Animal*. 4: 83-85.
- Araya, J. C., Tamayo, C., Ossandon, L. y Rodriguez, H. (2004).** Morphology and immunohistochemistry of the human vas deferens. *Rev, Chil, Tecnol, MBed*. 24: 1111-1117.
- ARBiotech. (2022).** Animal Reproduction Biotechnology. Consulta: 22 de noviembre 2022. Disponible en: <https://tienda.arbiotech.com.mx/product/equipure-2/>
- Auer, J. A. y Stick, J. A. (2012).** *Equine Surgery*. (4a edición). Missouri, EEUU. Elsevier Saunders.
- Aulesa, C., Cabrera, M., Alonso, R., Benítez, M. y Martínez, M. (2009).** Evaluación del sistema automatizado Sperm Class Analyzer®(SCA) para análisis del semen. *Revista del Laboratorio Clínico*, 2(1), 8-16.
- Avanzi, B. R., dos Santos Ramos, R., Araujo, G. H. M., Fioratti, E. G., Trinca, L. A., Dell'Aqua Jr, J. A., ... y Papa, F. O. (2015).** Fixed-time insemination with frozen semen in mares: is it suitable for poorly fertile stallions?. *Theriogenology*, 83(9), 1389-1393.
- Bailey, E., Fenning, N., Chamberlain, S. y Devlin, L. (2007).** Validation of sperm counting methods using limits of agreement. *J Androl*. 28:364-73.

- Ball, B., Crowe, J., Delfino, W., Kysar, P., Linfor, J., Meyers, A. y Tablin, F. (2006).** Equine Sperm Membrane Phase Behavior: The Effects of Lipid-Based Cryoprotectants. *Biology of Reproduction*, 74(2), 359-365.
- Ball, B. (2008).** Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: impacts on sperm function and preservation in the horse. *Animal Reproduction Science*, 107(3-4), 257-267.
- Barbas, J. y Mascarenhas, D. (2009).** Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue banking* 10 (1): 49-62.
- Barker, C. A. V. y Gandier, J. C. C. (1957).** Pregnancy In A Mare Resulting From Frozen Epididymal Spermatozoa *Can J Comp Med Vet Sci.* 21(2): 47–51.
- Barrier-Battut, I. (2013).** Collecte et traitement de la semence d'étalon: quoi de neuf. *Pratique Vétérinaire Équine* 177(45): 35-39.
- Barrier, I., Kempfer, A., Becker, J., Lebailly, L., Camugli, S. y Chevrier, L. (2016).** Development of a new fertility prediction model for stallion semen, including flow cytometry. *Theriogenology* 86 (4):1111-1131.
- Batellier, F., Gérard, N., Courtens, J. L., Palmer, E. y Magistrini, M. (2000).** Preservación de la calidad del esperma de semental por fosfocaseinato nativo: ¿un efecto directo o indirecto? *Suplemento fértil J Reprod.* 56 :69–77.
- Batellier, F., Magistrini, M., Fauquant, J. y Palmer, E. (1997).** Efecto de las fracciones de leche en la supervivencia de los espermatozoides equinos. *Teriogenología.* 48 :391–410. doi: 10.1016/S0093-691X(97)00250-1.
- Batellier, F., Vidament, M. y Fauquant, J. (2001).** Avances en la tecnología de semen enfriado. *Anim Reprod Sci.* 68 :181–90. doi: 10.1016/S0378-4320(01)00155-5.
- Benson, B. M. Jr. y McDonnell, S. M. (2011).** Lameness in Breeding Stallions and Broodmares. En: Ross W.M, Dyson S.J. *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse.* 2a.ed. Missouri. Elsevier. p. 1235-1242.
- Berndtson, W. E., Squires, E. L. y Thompson, D. L. (1983).** Spermatogenesis, testicular composition and the concentration of testosterone in the equine testis as influenced by season. *Theriogenology.* 20 (4): 449-457.
- Boeta, M., Díaz, D. M. y Hayen, V. S. (2017).** Manual de la práctica de profundización en reproducción equina.
- https://fmvz.unam.mx/fmvz/licenciatura/coepa/archivos/manuales_2013/Manual%20de%20Practicas%20de%20Profundizacion%20en%20Reproduccion%20Animal%20Equinos.pdf
- Bonilla, D. (2013).** “Sistemas de producción equina”. Universidad nacional abierta y a distancia, escuela de ciencias agrícolas, pecuarias y del medio ambiente. Neiva: Pp120-125.

- Booth, N. H. (1988).** Nonnaxcotic analgesics. En: Booth, N.H. and McDonald, LE. Veterinary Pharmacology and Therapeutics. Iowa State. Ames p. 351- 359.
- Boyle, M. S. (1992).** Artificial insemination in the horses. *Annales de Zootechnie*. 41: 311-318.
- Brass, K. (2001).** Inseminación artificial en la especie equina. En Palma Gustavo (Eds) Biotecnología de la reproducción (pp. 525-561). Argentina: Instituto nacional de tecnologías agropecuarias.
- Brinsko, S. P. y Varner, D. D. (1993).** Artificial insemination. *Equine Reproduction*. Ed. McKinnon. Pennsylvania.
- Cary, J. A., Madill, S., Farnsworth, K., Hayna, J. T., Duoos, L. y Fahning, M. L. (2004).** A comparison of electroejaculation and epididymal sperm Collection tecniques in stallions. *Can. Vet. J.* 45:35-41.
- Clement, F., Guerin, B., Vidament, M., Diemert, S. y Palmer, E. (1993).** Microbial quality of stallion semen. *Pratique Vétérinaire Equine* 25 (1): 37- 43.
- Crespo, F., Gutiérrez-Cepeda, L., Gosalvez, J., Serres, C. y Johnston, S. D. (2013).** Colloidal centrifugation of stallion semen results in a reduced rate of sperm DNA fragmentation. *Reproduction in Domestic Animals*, 48(2), e23-e25.
- Colenbrander, B., Gadella, B. y Stout, T. (2003).** The predictive value of semen analysis in the evaluation of the stallion fertility. *Reprod Domest Anim*; 38(4): 305-311.
- Coutinho da Silva, M. A., Seidel, G. E., Squires, E. L., Graham, J. K. y Carnevale, E. M. (2012).** Effects of components of semen extenders on the binding of stallion spermatozoa to bovine or equine zonae pellucidae. *Reproduction*. 143:577e85.
- Crump, J. (1994).** Manual semen collection from a Grevy`s Zebra stallion (*Equus grevyi*) onset of sperm production. Semen characteristics, and cryopreservation of semen, with a comparision to the sperm production from a Grant`s Zebra stallion (*Equus burchelli boehmi*). *Theriogenology*. 41:1011-1021.
- Crump, J. (1989).** Stallion ejaculation induced by manual stimulation of the penis. *Theriogenology*. 31: 341-346.
- Cruz, J. A. C. y Jaramillo, L. C. (2016).** Aspectos generales del proceso de conservación de semen equino: una revisión desde la congelación espermática. *Conexión Agropecuaria JDC*, 6(1), 45-64.
- Dalmau, C. S. (2012).** Métodos tradicionales y alternativos de extracción de semen. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 6(2), 125.
- Dean, C. J., Hobgood, A. M., Blodgett, G. P., Love, C. C., Blanchard, T. L. y Varner, D. D. (2012).** The addition of ticarcillin-clavulanic acid to INRA 96 extender for stallion semen cooling. *Equine Vet J Suppl.* 44:95e9.

- Davies, M. y Mina, C. (2003).** Equine Reproductive Physiology, Breeding and Stud Management. Cambridge, MA, USA: CABI Publishing. Web. 24 June 2015.
- Douglas-Hamilton, D. H, Smith., N. G., Kuster, C. E., Vermeiden, J. P. y Althouse, G. C. (2005).** Capillary-loaded particle fluid dynamics: effect on estimation of sperm concentration. *J Androl.* 26:115–22.
- Douglas-Hamilton, D. H., Smith, N. G., Kuster, C. E., Vermeiden, J. P. y Althouse, G. (2005).** Particula distribution in low-volume capillaryloaded chambers. *J Andrology.* 26:107–13.
- Dutra, M. C., Graglia, G. F. y Martínez P. M. M. (2013).** Diluyentes de semen equino para su uso fresco y refrigerado por 24 y 48 horas: comparación entre leche descremada UHT y un diluyente comercial (Equipro). Tesis de grado. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Veterinaria.
- Fabrizi, R., Porcu, E., Marsella, T., Primavera, M. R., Seracchioli, R., Ciotti, P. M., ... y Flamigni, C. (1998).** Oocyte cryopreservation. *Human Reproduction*, 13(suppl_4), 98-108.
- Fayrer-Hosken, R., Abreu-Barbosa, C., Heusner, G. y Jones, L. (2008).** Cryopreservation of stallion spermatozoa with INRA96 and glycerol. *Journal of Equine Veterinary Science*, 28(11), 672-676.
- Galina, C. y Valencia. (2008).** Reproducción de los Animales domésticos. Tercera Edición. Limusa. Pag: 27-42.
- Gilmore, J., Mcgann, L., Liu, J., Gao, D., Peter, A., Kleinhans, F. y Critser, J. (1995).** Effects of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa. *Biology of reproduction* 53 (5): 985-995.
- Giraldo, N., Villegas, J. E. C. y Araque, N. V. (2006).** Evaluación del efecto de la refrigeración sobre la calidad del semen equino. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 1(2), 8-16.
- Gómez-Cuétara, C. (1996).** Manejo del Semental. En: Equino Aspectos De Cría Y Clínica. Colección Ciencias Veterinarias. Consejo General De Colegios Veterinarios De España. Eds. Plubex Studio S.L. Madrid, vol XVIII, 61-80.
- Graham, J. K. (1996).** Analysis of stallion semen and its relation to fertility. *Veterinary Clinics of North America. Equine practice* Vol.12, no1 p. 119-130.
- Graham, J. y Mocé, E. (2005).** Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology.* 64:492-504.
- Guerrero, H. Z. (2015).** Evaluación de la calidad del semen equino ¼ de milla en dos diferentes épocas (invierno-primavera) en la Comarca Lagunera [Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro]. Repositorio Digital Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
- Hafez, B. (2002).** Inseminación artificial en animales. Séptima edición, interamericana- McGraw-Hill, México. 199-215.

- Hammerstedt, R. y Graham, J. (1992).** Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology* 29 (1): 26-38.
- Hartwig, F. P., Lisboa, F. P., Hartwig, F. P., Monteiro, G. A., Maziero, R. R. D. y FreitasDell'Aqua, C. P. (2014).** Use of cholesterol-loaded cyclodextrin: an alternative for bad cooler stallions. *Theriogenology*. 81:340e6.
- Hess, R. A. (1999).** Spermatogenesis overview, in *Encyclopedia of Reproduction*, E.a.J.D.N. Knobil, Editor. Academic Press: San Diego.
- Hidalgo, M., Rodríguez, I., Dorado, J., Sáenz, J. y Soler, C. (2005).** Effect of sample size and staining methods on stallion sperm morphometry by the Sperm Class Analyze. *Vet. Med. Czech*. 50(1):24-32.
- Hillman, B. R., Liu, M. y Neely, P. (1983).** *Equine Reproduction*. Hoffmann-Le Roche Inc. USA.
- Hoffmann, N., Oldenhof, H., Morandini, C., Rohn, K. y Sieme, H. (2011).** Optimal concentrations of cryoprotective agents for semen from stallions that are classified 'good' or 'poor' for freezing. *Anim Reprod Sci* 125: 112-118. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.03.001>.
- Hoogewijs, M., De Vlieghe, S., De Schauwer, C., Govaere, J., Smits, K., Hoflack, G., De Kruif, A. y Van Soom, A. (2011).** Validation and usefulness of the Sperm Quality Analyzer V equine for equine semen analysis. *Theriogenology*. 75:189-194.
- Humeco. (2018).** Conozca iSperm, un sencillo dispositivo para analizar el semen, sin microscopio, portátil y multiespecie. ¡Ideal para el campo. Consulta: 21 de noviembre 2022. Disponible en: <https://www.humeco.net/noticias/conozca-isperm-un-sencillo-dispositivo-para-analizar-el-semen-sin-microscopio-portatil-y-multiespecie-ideal-para-el-campo#:~:text=El%20iSperm%20est%C3%A1%20compuesto%20de,a%20realizar%20con%20el%20eyaculado>.
- iSperm. (2022).** El primer analizador de semen automatizado para el Laboratorio y el Campo. Consulta: 21 de noviembre 2022. Disponible en: <https://es.isperm.co/features>
- Johannisson, A., Morrell, J. M., Thoren, J., Jonsson, M., Dalin, A. M. y Rodriguez-Martinez, H. (2009).** Colloidal centrifugation with androcol 1-E (TM) pro longs stallion sperm motility, viability and chromatin integrity. *Animal Reproduction Science*, 116(1-2), 119-128.
- Johnson, L. D. L., Thompson, Jr. y Varner, D. D. (2008).** Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis. *Anim Reprod Sci*, 105(1-2): p. 23-51.
- Katila, T. (2001).** In vitro evaluation of frozen-thawed stallion semen: A review. *Acta Vet. Scand*. 42(2):199-217.
- Kenney, R. M., Hurtgen, J., Pierson, R., Witherspoon, D. y Simons, J. (1983).** Manual for clinical fertility evaluation of the stallion. Hastings, Nebraska: Society for Theriogenology.100.

- Klein, U., Gimpl, G. y Fahrenholz, F. (1995).** Alteration of the myometrial plasma membrane cholesterol content with beta-cyclodextrin modulates the binding affinity of the oxytocin receptor. *Biochemistry* 34:13784e93.
- Koning, H. y Liebich, H. (2005).** Anatomía veterinaria tomo 2. México. Ed. Panamericana. 2da Pp 119-134.
- Koppers, A. J., Garg, M. L. y Aitken, R. J. (2010).** Stimulation of mitochondrial reactive oxygen species production by unesterified, unsaturated fatty acids in defective human spermatozoa. *Free Radic Biol Med*, 48(1): p. 112-9.
- Kuisma, P., Andersson, M., Koskinen, E. y Katila, T. (2006).** Fertility of frozen thawed stallion semen cannot be predicted by the current used laboratory methods. *Acta Veterinaria Scandinavica* 48 (1): 14-21.
- LeFrappier, L., Walston, L. y Whisnant, C. S. (2010).** Comparación de varios diluyentes para el almacenamiento de espermatozoides de semental enfriados durante 72 horas. *J Equine Vet Sci.* 30 :200–4. doi: 10.1016/j.jevs.2010.02.007.
- Lizaraso, A. (2009).** Comparación Morfométrica de Espermatozoides Humanos y de Animales Domésticos, Teñidos con la Coloración Árbol de Navidad.
- Loomis, P. R. (2006).** Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. *Vet. Clin. N. Am. (Equine)* 22, 663–676.
- Loomis, P. R. (2011).** The equine frozen semen industry. *Animal Reproduction science*, 68; 191-200
- Loomis, P. y Graham, J. (2008).** Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Animal Reproduction Science*, 105(1), 119-128.
- Love, C. (2011).** Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of stallions. *Theriogenology*. 76(3):547-557.
- Magistrini, M., Vidament, M. y Clemenet, F. (1996).** Fertility prediction in stallions. *Anim. Reprod. Sci.* 42:181-188.
- Manjunath, P. (2012).** New insights into the understanding of the mechanism of sperm protection by extender components. *Anim Reprod.* 9:809e15.
- Mateos, E. (1996).** Biotecnología de la Reproducción Equina. En: *Equino Aspectos De Cría Y Clínica. Colección Ciencias Veterinarias. Consejo General De Colegios Veterinarios De España.* Eds. Plubex Studio S.L. Madrid, vol XVIII, 81-100.
- McDonnell, S. M. (1992).** Ejaculation. *Physiology and Dysfunction, Veterinary clinics of North America Equine Practice* 8 (1): 57-70.
- McDonnell, S. M. (2001).** Oral imipramine and intravenous xylazine for pharmacologically-induced ex copula ejaculation in stallions. *Animal Reproduction Science* 68: 153–159.

- Mc Donnell, S. M. y Love, C. C. (1991).** Manual stimulation collection of semen from stallion: Training time, semen quality, and sexual behavior. *Theriogenology* 33: 1201-1205.
- Mc Donnell, S. M. y Odian, M. J. (1994).** Imipramina and Xilacine-induced ex copula ejaculation in stallion. *Theriogenology* 41: 1005-1010.
- Mc Donnell, S. M., Pozor, M. A., Beech, J. y Sweeney, R. W. (1991).** Use of manual stimulation for collection of semen from an atactic stallion unable to mount. *J. A. V. M. A.* 199: 753-754.
- Medeiros, A. S. L., Gomes, G. M., Carmo, M. T., Papa, F. O. y Alvarenga, M. A. (2002).** Cryopreservation of stallion sperm using different amides. *Theriogenology*, 58:273- 276.
- Mejia R, N. (2016).** Descripción de la espermatogénesis en el caballo empleando la biopsia testicular: descripción de 3 casos.
- Mesa, A. y Henao, G. (2012).** Efecto del colesterol y la dimetilformamida sobre parámetros posdescongelación en espermatozoides de caballos criollos colombianos. *Rev. MVZ Córdoba.* 17(1):2908-2815.
- Mesa, A. M. y Henao, R. G. (2012).** Efecto del colesterol y la dimetilformamida sobre parámetros posdescongelación en espermatozoides de caballos criollos colombianos. *Revista MVZ Córdoba*, 17(1), 2908-2915.
- Morel, M. C. D. (1999).** Equine artificial insemination CABI Publishing New York 406p.
- Morel, D. (1999).** Equine Artificial insemination. (pp. 234 -292) UK. CABI publishing.
- Morillo, A., Ortega, C., Macías, B., Morrell, J., Rodriguez, H., Tapia, J. y Peña, F. (2011).** Freezing stallion semen with the new Caceres extender improves post thaw sperm quality and diminishes stallion -to-stallion variability. *Animal Reproduction Science*, 127(1-2), 78-83.
- Morillo, A., Pessanha, T., López, M., Rocha, A. y Peña, F. (2012).** Comparison of two freezing extenders for stallion spermatozoa: Caceres and BotuCRIO®. *Journal of Equine Veterinary Science*, 32(8), 499-500.
- Morrell, J. (2006).** Update on semen technologies for animal breeding. *Reprod Dom Anim.* 41: 63-67.
- Morrell, J. M. (2009).** Prevention of pathogen transmission through breeding in horses . *Reproduction in Domestic Animals*, 44, 72-72.
- Mrackova, M., Blahova, Z. y Sedlinska, M. (2013).** The reliability of two different protocols for pharmacologically induced ejaculation in donkeys (*Equus asinus*), *Journal of Equine Veterinary Science* 33: 1121-1123.
- Muradas, P. R., Weiss, R. R., Kozicki, L. E., Granemann, L. C., Santos, I. W. y Pimpão, C. T. (2006).** Algunos parámetros de viabilidade de espermatozoides equinos colhidos por vagina artificia e por lavagem da cauda do epididimo. *Arch. Vet. Sci.* 11:69-74.

- Novello, G., Podico, G., Segabinazzi, L. G., Lima, F. S. y Canisso, I. F. (2020).** Stallion semen cooling using native phosphocaseinate-based extender and sodium caseinate cholesterol-loaded cyclodextrin-based extender. *Journal of equine veterinary science*, 92, 103104.
- Novello, G., Podico, G., Segabinazzi, L. G. T. M., Lima, F. S. y Canisso, I. F. (2020).** Enfriamiento de semen de semental usando un diluyente basado en fosfocaseinato nativo y un diluyente basado en ciclodextrina cargada con colesterol y caseinato de sodio. *J Equine Vet Sci*. 92 :103104. doi: 10.1016/j.jevs.2020.103104.
- Olivera, M., Ruiz, T., Tarazona, A. y Giraldo, C. (2006).** El espermatozoide, desde la eyacuación hasta la fertilización. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 19(4), 426-436.
- Ortega, F. C., González, F. L., Macías, G. B., Salazar, S. C., Morillo, R. A., Rodríguez, M. H., Tapia, A. J. y Peña, J. F. (2009).** Effect of cryopreservation on nutritive oxide production by stallion spermatozoa. *Biology of reproduction*. 81: 1106-1111.
- Pagl, R., Aurich, J. E., Müller-Schlosser, F., Kankofer, M. y Aurich, C. (2006).** Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skim milk-based extender for storage of equine semen at 5 C. *Theriogenology* 66: 1115e22.
- Paredes, C. A. L. (2015).** Determinación de la viabilidad espermática post-descongelamiento, bajo efecto de la adición fraccionada de dimetilformamida en caballo criollo colombiano.
- Parks, J. y Graham, J. (1992).** Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 38: 209-222. doi: 10.1016/0093-691X(92)90231-F.
- Peña, F. M., García, B., Samper, J., Aparicio, I., Tapia, J. y Ortega, F. C. (2011).** Dissecting the molecular damage to stallion spermatozoa: the way to improve current cryopreservation protocols? *Theriogenology* 76: 1177- 1186. doi: 10.1016/j.theriogenology.- 2011.06.023.
- Peña, V. F. J., U. de E. y Ortega, F. C. (2011).** Factores implicados en la variabilidad individual en la respuesta a la congelación del eyaculado equino: estructura de subpoblaciones, estrés oxidativo y cambios apoptóticos (dissertation). Universidad de Extremadura (España).
- Pérez, Q. D. D. (2015).** Evaluar el efecto crioprotector de la dimetilformamida en diferentes tiempos de adición en la criopreservación de semen en caballos criollos colombianos.
- Pérez, V. J. F. (2018).** Crio Preservación de Semen en Equinos (Bachelor's thesis, Ecuador, Latacunga: Universidad Técnica de Cotopaxi (UTC)).
- Pickett, B.W. (1993b).** Collection and evaluation of semen for artificial insemination. En: *Equine Reproduction*. Ed. McKinnon, Pennsylvania.
- Pickett, B.W. (1993a).** Factors affecting sperm production and output. En: *Equine reproduction*. Ed. McKinnon, Pennsylvania.
- Pickett, B.W. (1989).** Management of the stallion for maximum reproductive efficiency. II. *Animal Reproduction Laboratory Bulletin No 5*. Fort Collins, Colorado State, University.

- Pillet, E., Batellier, F., Duchamp, G., Furstoss, V., Vern, Y., Kerboeuf, D., Vidament, M. y Magistrini, M. (2008).** Freezing stallion semen in INRA96®-based extender improves fertility rates in comparison with INRA82. *Dairy Science & Technology* 88 (2): 257-265.
- Plante, G., Lusignan, M. F., Lafleur, M. y Manjunath, P. (2015).** Interaction of milk proteins and Binder of Sperm (BSP) proteins from boar, stallion and ram semen. *Reprod Biol Endocrinol* 13:92.
- Proctor, J., Boone, W. y Higdon, H. (2009).** Comparison of the manual IVOS and SCA methods for semen analysis reporting. *J. Clin. Embryol.* 12(4):5-7.
- Quintero, A., Miró, J., Rigau, A. y Rodríguez, J. (2003).** Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology.* 59:1973-1990.
- Ramires, N. C., Sancler da Silva, Y. F. R., Resende, H. L., Guasti, P. N., Monteiro, G. A. y Papa, P. M. (2015).** Control methods and evaluation of bacterial growth on fresh and cooled stallion semen. *J Equine Vet Sci* 2015;35:277e82.
- Rečková, Z., Filipčík, R., Soušková, K., Kopec, T., Hošek, M. y Pešan, V. (2022).** The efficiency of different types of extenders for semen cooling in stallions. *Animal bioscience*, 35(5), 670–676.
- Restrepo, G., Usuga, A., Montoya, J., Celis, A. y Henao, A. (2014).** Evaluación de dos diluyentes para la criopreservación de semen de caballos de la raza criollo colombiano. *Revista Lasallista de Investigación* 11(2): 63-70.
- Rossdale, P. (1991).** *Horse Breeding.* España, Edit. Acribia S.A. Zaragoza. pp 358- 373.
- Saltos, J. C. (2007).** Efectos de la centrifugación en la motilidad espermática del semen equino refrigerado. Tesis de grado. Universidad San Francisco de Quito.
- Samper, J. C. (2009c).** *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*, 2nd, ed., p. 59.
- Samper, J. y García, A. (2008).** *Journal of the American College of Radiology.* Obtenido de *Jurnal of the American College of Radiology.*
- Sánchez, M. y Palacios, L. (2005).** Manual de reproducción en equinos. cd interactivo que para obtener el Título de médico veterinario y zootecnista. México, Universidad de Guadalajara centro universitario de ciencias biológicas y agropecuarias división de ciencias veterinarias. Pp. 65-72.
- Serres, D. C. y Álvarez G. de R. A. L. (2006).** Artificial insemination in horses. *Equinus (España).*
- Sielhorst, J., Hagen, C., Behrendt, D., Schuette, B., Burger, D., Martinsson, G. y Sieme, H. (2016).** Effect of multiple freezing of stallion semen on sperm quality and fertility. *Journal of Equine Veterinary Science* 40: 56-61.
- Sieme, H., Harrison, R. A. P. y Petrunkina, A. (2008).** Cryobiological determinants of frozen semen quality, with special reference to stallion. *Animal Reproduction Science* 107 (3): 276-292.

- Sieme, H., Martinsson, G., Rauterberg, H., Walter, K., Aurich, C., Petzoldt, R. y Klug, E. (2003).** Application of techniques for sperm selection in fresh and frozen-thawed stallion semen. *Reprod. Domest. Anim.*, 38(2):143-40.
- Sisson, S. y Grossman, J. D. (1986).** Anatomía de los Animales Domésticos, 4ª edición. Saunders Co.
- Sisson, S. y Grossman, J. (2005).** Anatomía de los animales domésticos. 5th ed. Barcelona: MASSON, S. A. Pp 593-597. Acceso 16 Ene. 2018. Disponible en: [<http://ISBN 84-458-0722-6>].
- Squires, E., Keith, S. y Graham, J. (2004).** Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology* 62 (6): 1056-65.
- Squires, E. L. (2009).** Changes in equine reproduction: have they been good or bad for the horse Industry? *Journal of Equine Veterinary Science*; 29: 268-273.
- Stoll, A., Loce, C. C. y Ball, B. A. (2012).** Use of a Single-Layer Density Centrifugation Method Enhances Sperm Quality in Cryopreserved Thawed Equine Spermatozoa. *J. Equine Vet. Sci.*, 33(7):547-51.
- Stornelli, M. C., Tittarelli, C., Savignone, C. y Stornelli, M. A. (2005).** Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. *Analecta veterinaria*, 25(2), 28-35.
- Stover, J., Seager, S. W. J., Dolensk, E. P., Doherty, J., Wildt, D. F. y Platz, C. C. (1981).** Electroejaculation and semen evaluation of Przewalski horse (*Equus przewalski*). *Am Assoc Zoo Vet.* 144-145.
- Tischner, M. (1979).** Evaluation of deep-frozen semen in stallions. *Journal of Reproduction and Fertility* (27): 53-59.
- Tomlinson, M., Turner, J., Powell, G. y Sakkas, D. (2001).** One-step disposable chambers for sperm concentration and motility assessment: how do they compare with the World Health Organization's recommended methods. *Hum Reprod.* 16:121-4.
- Trejos, S. A. (2009).** Manejo reproductivo del semental equino. Monografía de título. México división regional de ciencia animal universidad autónoma agraria "Antonio Narro" unidad laguna. Pp5.
- Valencia, L. C. E. (2006).** Elaboración de diluyentes de semen porcino.
- Varner, D. D., Blanchard, T. L., Love, C. L., Garcia, M. C. y Kenney, R. M. (1988).** Effects of cooling rate and storage temperature on equine spermatozoa motility parameters. *Theriogenology* 29: 1043-1054.
- Velázquez, C. G. L. (2017).** Práctica 1. Anatomía del aparato reproductor masculino. Módulos: Crecimiento y desarrollo intrauterino parto, puerperio y periodo perinatal.
- Vidament, M., Daire, C., Yvon, J., Doligez, P., Bruneau, B., Magistrini, M. y Ecot, P. (2002).** Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and/or dimethyl formamide. *Theriogenology*, 58(2- 4), 249-251.
- Voss, I. J. y McKinnon, O. A. (1993).** *Equine Reproduction.* Lea and febiger Philadelphia.

- Yáñez-Ortiz, I., Catalán, J., Rodríguez-Gil, J. E., Miró, J. y Yeste, M. (2021).** Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep. *Animal Reproduction Science*, 106904.
- Yates, D. J. y Whitacre, M. D. (1993).** Inseminación artificial en el equino. In: *Veterinary Clinics of North América. (Equine practice)*. By: W. B. Saunders Company. Eds. Intermedica. Philadelphia: vol. 4; nº 2, 173-192.
- Zarco, L. y Boeta, M. (2000).** Reproducción Equina. Segunda Edición. Academia de investigación de Biología de la reproducción equina, A.C. UNAM. Pag: 147-174.