

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



**EVALUACIÓN DE LA CALIDAD SEMINAL EN FRESCO Y
POSDESCONGELADO DE SEMENTALES EQUINOS DE LA COMARCA
LAGUNERA**

POR:

ROSALINDA BORUNDA BALDERRAMA

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA

OBTENER

EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN COAHUILA, MÉXICO

JUNIO 2010.

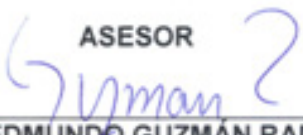
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL




EVALUACIÓN DE LA CALIDAD SEMINAL EN FRESCO Y
POSDESCONGELADO DE SEMENTALES EQUINOS DE LA COMARCA
LAGUNERA

TESIS:
APROBADA POR EL COMITÉ

ASESOR


MVZ. EDMUNDO GUZMÁN RAMOS
PRESIDENTE DEL JURADO


MVZ. RODRIGO ISIDRO SIMÓN ALONSO
COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal

TORREÓN COAHUILA, MÉXICO

JUNIO 2010

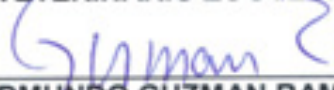
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA


DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
TESIS
POR
ROSALINDA BORUNDA BALDERRAMA

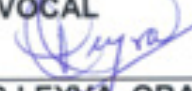
EVALUACIÓN DE LA CALIDAD SEMINAL EN FRESCO Y
POSDESCONGELADO DE SEMENTALES EQUINOS DE LA COMARCA
LAGUNERA

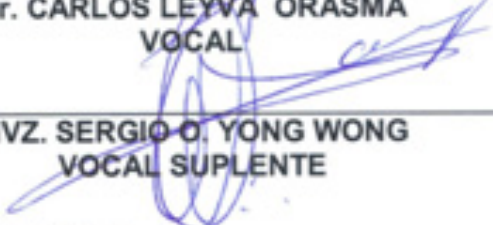
TESIS ELABORADA BAJO LA SUPERVISIÓN DEL COMITÉ
PARTICULAR DE ASESORÍA Y APROBADA COMO REQUISITO
PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA


MVZ. EDMUNDO GUZMAN RAMOS
PRESIDENTE


MC. JUAN LUIS MORALES CRUZ
VOCAL


Dr. CARLOS LEYVA ORASMA
VOCAL


MVZ. SERGIO O. YONG WONG
VOCAL SUPLENTE

TORREÓN COAHUILA, MÉXICO

JUNIO 2010.

AGRADECIMIENTOS

Le doy gracias a Dios, por haberme permitido llegar hasta aquí y terminar mi carrera.

A mis padres el Sr. Guillermo Borunda Mariñelarena y la Sra. María Adela Balderrama Hernández, por haberme guiado por este camino, apoyarme incondicionalmente y permitirme ser una profesionalista. Gracias por todo su amor y cariño. Los amo mucho.

A mi familia, hermanos, hermana, y familiares, por apoyarme y estar presentes a pesar de la distancia, por darme su cariño y creer en mí. Gracias, los quiero mucho.

A mis amigas Leonela, Laura y Mary Carmen, por todos los momentos que compartimos juntas, por haberme dado lo más valioso, su amistad, gracias por compartir 5 maravillosos años, juntas hemos vivido muchas experiencias buenas y malas, pero al final estamos juntas y unidas, lo logramos.

A mi novio Héctor T. por su amistad, cariño y amor. Por apoyarme y estar siempre a mi lado. Gracias.

A todas mis amistades que me han hecho saber que en cualquier momento puedo contar con ellas. Gracias

A los docentes M.V.Z. Edmundo Guzmán R., M.V.Z. Juan Luis Morales, Dr. Carlos Leyva, M.V.Z. Delmar Aguilar M. Por confiar en mí y ayudarme a que este proyecto se hiciera realidad. Gracias

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico á una persona a quien yo amo demasiado, es para mi padre el SR. Guillermo Borunda Mariñelarena, por representar en mí la figura más grande de mi vida, a quien admiro y respeto. Gracias por todo ese amor, confianza y apoyo que me dio, gracias por demostrarme que salir adelante es posible sin importar las adversidades que se nos presenten, vencer los obstáculos y demostrarme a no decirle a Dios que tan grandes son los problemas, sino decirle a los problemas que tan grande es Dios.

Para la gran mujer que me dio la vida y supo guiarme en mi camino, mi madre María Adela Balderrama Hernández, por todo su apoyo, comprensión y amor.

Gracias papá y mamá. Los amo.

RESUMEN

Hoy en día la biotecnología equina ha avanzado enormemente, es por eso que este trabajo tiene como objetivo principal llevar a cabo el procesamiento de semen y evaluar su calidad. Logrando una conservación favorable para la I.A.

El trabajo de investigación se llevó a cabo de febrero a junio del año 2010, tomando 5 sementales de fertilidad probada, y una yegua en celo. En las instalaciones de reproducción animal del CEBIOREP del departamento de reproducción animal de la UAAAN-UL.

Se procedió a recolectar semen de distintos caballos, las muestras fueron analizadas macroscópicamente (volumen y apariencia), así como microscópicamente (volumen, concentración, motilidad en fresco, morfología). El semen se proceso para su conservación y se revisó pos descongelación.

Los valores a evaluar microscópicamente fueron volumen libre de gel, concentración espermática, motilidad, morfología y motilidad pos descongelado.

De acuerdo a los resultados obtenidos de este estudio se confirmó que la conservación del semen fue favorable, con la técnica utilizada se logró una motilidad pos descongelación eficiente, ya que los sementales evaluados en la Comarca Lagunera se encontraron dentro de los parámetros normales.

Palabras clave: Espermatozoides, semen equino, sementales, crioconservación, posdescongelado, motilidad

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	I
DEDICATORIA	II
RESUMEN.....	III
ÍNDICE DE CONTEDO.....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VI
ÍNDICE DE CUADROS.....	VII
I INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Hipótesis.....	2
1.2 Objetivo General.....	2
1.3 Objetivos específicos.....	2
II REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 Aparato reproductor del caballo.....	3
2.1.1 Testículos.....	3
2.1.2 Escroto.....	3
2.1.3 Epidídimo.....	4
2.1.4 Cordón espermático:.....	4
2.1.5 Conducto deferente.....	5
2.1.6 Glándulas sexuales accesorias.....	5
2.1.7 Ámpula.....	5
2.1.8 Vesículas seminales.....	5
2.1.9 Próstata.....	6
2.1.10 Glándulas bulbouretrales.....	6
2.1.11 Pene.....	6
2.1.12 Prepucio.....	7

2.2 Semen equino:.....	7
2.3 Espermatogénesis	7
III MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
V CONCLUSIONES.....	23
VI LITERATURA CITADA	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Contenido	Página
Figuras 1. Esquema de la espermatogénesis en el semental equino.....	9
Figuras 2. Bitácora para llevar el registro de cada caballo procesado...	10
Figuras 3 Yegua con tirapié para la seguridad del semental y operador....	11
Figuras 4: Vagina artificial “Universidad de Colorado”, con todos sus aditamentos.....	12
Figuras 5 Presentación del semental ante la yegua para la estimulación del mismo.....	12
Figuras. 6: Caballo mostrando la posición de flehmen al estar presenta la yegua.....	13
Figuras 7 El garañón montando a la yegua para realizar la extracción.....	13
Figuras 8. Posición correcta del operador al hacer la recolección del semen.....	14
Figuras 9 Análisis del semen microscópicamente en el laboratorio.....	14
Figura 10. Conteo espermático evaluando malformaciones con tinción compuesta de eosina-nigrosina.....	16

ÍNDICE DE CUADROS

Contenido

Página

Cuadro 1 Fórmula para la elaboración del diluyente para la centrifugación.....	17
Cuadro 2 Fórmula para la elaboración del diluyente de congelación.....	18
Cuadro 3 Resultados de las variables a medir.....	20

I INTRODUCCIÓN

Durante años los caballos han sido una pieza importante para el hombre adquiriendo un valor significativo. Actualmente existe una gran variedad de razas equinas, que son dedicadas a diferentes actividades ecuestres, sin olvidar la gran importancia que ocupa el caballo criollo en la vida rural (Boeta., *et al*, 2000).

La reproducción de los equinos se ha mantenido casi en su totalidad por monta natural, poniendo en riesgo la salud tanto del garañón como de la yegua, además la Inseminación Artificial (IA) reduce las distancias, a través del transporte de semen frío o congelado dentro del país o bien internacional, ya que se puede evitar el transporte de la yegua con o sin potrillo al pie hasta el reproductor, por lo tanto, se reducen los costos, y limitando la mejora genética en esta especie al no aplicar biotecnologías reproductivas.

Las herramientas y/o procesos tecnológicos que el hombre aplica de manera directa o indirecta a la reproducción, en este caso animal, se conocen como Biotecnologías Reproductivas (Losinno L. 2008).

Hoy en día, la biotecnología en equinos ha avanzado enormemente, dando la oportunidad de llevar a cabo una de las prácticas más importantes en la reproducción de equinos, como es: el manejo, procesamiento y preservación del semen.

Es por esto, que el presente trabajo de investigación tiene como objetivo: Evaluar la efectividad de un protocolo establecido para la crioconservación del semen equino en caballos de la Comarca Lagunera.

1.1 Hipótesis

El método tradicional de extracción seminal y crioconservación para semen equino, se comporta de manera similar en sus parámetros en caballos de la Comarca Lagunera.

1.2 Objetivo General

Evaluar la efectividad de un protocolo establecido para la crioconservación del semen equino en caballos de la Comarca Lagunera.

1.3 Objetivos específicos

1.2.1 Evaluar el Método de Extracción seminal con vagina artificial en caballos de la Comarca Lagunera.

1.1.2 Evaluar el comportamiento del semen equino, tanto en fresco como en posdescongelado en los parámetros tradicionales de semen procedente de caballos de la Comarca Lagunera.

II REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Aparato reproductor del caballo

Tener el conocimiento de la anatomía de los órganos genitales de los caballos, nos ayuda a realizar la evaluación de la capacidad reproductiva del semental para llevar a cabo el manejo del semen de caballo en la reproducción artificial y así poder evaluar la capacidad reproductiva del semental, es necesario hacer un examen detallado de los órganos externos e internos por lo que es importante saber la anatomía de estos órganos, que se clasifican en: testículos, escroto, cordón espermático, epidídimo, glándulas accesorias (ámpulas, vesículas seminales, próstata y glándulas bulbouretrales) prepucio y pene (Zarco, 2000).

2.1.1 Testículos

Son los órganos sexuales primarios del macho, tienen la función de producir los gametos (espermatozoides) y síntesis de andrógenos. Los testículos se encuentran en la región inguinal, y su tamaño varía de acuerdo a la edad, época del año y raza. La unidad funcional del testículo es el túbulo seminífero, constituido por tejido germinal, que es el que le da origen a los espermatozoides y está constituida por células de Sertoly. El túbulo está forrado por células mioideas que impulsan el avance de los espermatozoides (Zarco, 2000).

2.1.2 Escroto

Zarco (2000) menciona que es un órgano especializado que permite el funcionamiento normal de los testículos, para lo cual actúa como órgano termorregulador.

Está formado por varias capas:

- a) La piel: delgada y elástica, glándulas sebáceas y glándulas sudoríparas, un rafe escrotal longitudinal.
- b) Dartos: íntimamente adherido a la piel, a lo largo del rafe se forma un tabique que parte en dos bolsas al escroto, al contraerse o relajarse los testículos son acercado o alejados del cuerpo, participa en la termorregulación del testículo.
- c) Fascia escrotal
- d) Capa parietal de la túnica vaginal: contiene vasos y nervios.

2.1.3 Epidídimo

El canal del epidídimo es la continuación de los conductos eferentes, anatómicamente están divididos en tres partes: la cabeza, el cuerpo y la cola. En la función del epidídimo se incluyen el transporte, almacenamiento maduración y concentración de los espermatozoides. Las funciones están reguladas hormonalmente, los movimientos peristálticos de este órgano son responsables del paso de los espermatozoides ya que estos están inmóviles dentro del epidídimo (Boyle, 1992., Galina, 2008).

2.1.4 Cordón espermático:

Empieza en el anillo inguinal abdominal, se extiende oblicuamente hacia abajo a través del canal inguinal, pasa por encima del pene y termina en el borde de inserción del testículo (Morel, 1999).

El cordón espermático consta de las siguientes partes: músculo cremaster, arteria y vena espermática, nervios simpáticos, conducto

deferente, musculo cremaster interno y la capa visceral de la túnica vaginal (Zarco, 200).

2.1.5 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 at*, 2004, Zarco, 2000).

2.1.6 Glándulas sexuales accesorias

La mayor parte del volumen del eyaculado se efectúa por las secreciones de las glándulas sexuales accesorias (Zarco, 2000).

Boyle (1992) y Zarco (2000) mencionan que los espermatozoides recién eyaculados muestran vigorosa motilidad. Esto se debe a que son activados al mezclarse en la uretra con las secreciones de las glándulas accesorias.

2.1.7 Ámpula

Poco antes de llegar a la uretra el conducto deferente se forma un engrosamiento de la pared que resulta de la presencia de numerosas glándulas sexuales accesorias de aproximadamente 0.7 a 2.0 cm (Boyle, 1992).

2.1.8 Vesículas seminales

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 de él epidídimo (Galina, 2008).

2.1.9 Próstata

Es una glándula lobulada que se encuentra en el principio de la uretra que consta de dos lóbulos laterales y un istmo que los une, la próstata secreta fluidos cerosos para limpiar y lubricar la uretra durante el estímulo pre coital, la próstata también contribuye con una porción importante del fluido del eyaculado con electrolitos estimulantes de la movilidad espermática (Zarco, 2000).

2.1.10 Glándulas bulbouretrales

Son dos glándulas que se sitúan a cada lado de la próstata, sus secreciones contribuyen con una pequeña porción del eyaculado (Galina, 2008).

2.1.11 Pene

El pene es el órgano copulatorio del macho. En el equino está constituido por una raíz un cuerpo y un glande. El pene del garañón es de tipo vascular, por lo que la erección depende de la acumulación de sangre en un sistema de senos venosos. La erección es iniciada por estímulos que llegan al cerebro, se procesa la información y se originan impulsos parasimpáticos. Al dilatarse las arteriolas del pene se comienza a acumular sangre en los cuerpos cavernosos. Al mismo tiempo se contraen los músculos isquiocavernoso y bulboesponjoso, lo que comprime a la vena dorsal del pene e impide el retorno venoso. La erección termina al relajarse los músculos (Galina, 2008., Zarco, 2000)

2.1.12 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, 2000).

2.2 Semen equino:

Los dos principales componentes del semen son los espermatozoides y el plasma seminal. El plasma seminal sirve como sustrato para los espermatozoides, los protege de las fluctuaciones osmóticas, previene la oxidación de otros componentes químicos y actúa como agente de coagulación (Morel, 1999).

La eyaculación se divide en tres fracciones:

- a) La pre-secreción: se observa cuando el semental salta y tiene la función de limpiar y lubricar la uretra.
- b) La fracción rica: contiene de un 80 a 90% de espermatozoides y componentes bioquímicos.
- c) La fracción pobre: también conocida como fracción gel, es producidas por las vesículas seminales y posee baja concentración de espermatozoides (Mann, 1975).

2.3 Espermatogénesis

Es el proceso de gametogénesis en el macho (Galina, 2008) representa el total de los cambios que dan lugar a la transformación de las células primordiales (Dukes., *et al.* 1981).

Durante el desarrollo embrionario, células especiales llamadas células germinales primordiales emigran desde la región del saco vitelino del embrión hacia las gónadas indiferenciadas. Las células germinales se

localizan en el epitelio seminífero, cuya estructura esta mantenida por las células de Sertoly (Cole, *et al* 1977).

Las células germinales son las únicas que poseen la capacidad de dividirse por meiosis y reducir en el numero de cromosomas, siendo responsable de la carga genética (Zarco, 2000).

La formación de los gametos comprende fases secuenciales de mitosis, meiosis y postmeiosis. A través de la meiosis, reduce por la mitad el número de cromosomas y además produce células distintas entre sí (Galina, 2008).

Al acercarse la pubertad, las espermatogonias empiezan a dividirse aceleradamente por mitosis, mientras en el espacio intersticial las células mesenquimales también empiezan a diferenciarse y dar origen a las células de Leydig, el ciclo espermatogénico comienza con una célula madre o espermatogonia de tipo A, constituye el punto de partida de una serie espermatotogénica. (Zarco, 2000).

Elementos celulares del ciclo espermatogénico:

- a) Espermatogonias: Proceden de los gonocitos y están contenidas en la capa de los túbulos seminíferos.
- b) Espermatocitos: Los espermatocitos son el resultado de la mitosis de espermatogonias y son las células germinativas que sufren división meiótica. Al final de la profase meiótica coincide con la fase 4 del epitelio seminífero, durante la que suceden rápidamente la metafase, anafase y telofase. En este momento aparecen los espermatocitos secundarios.

c) Espermátidas: Es la suma de todos los cambios nucleares, estos cambios determinan el producto final: espermatozoides.

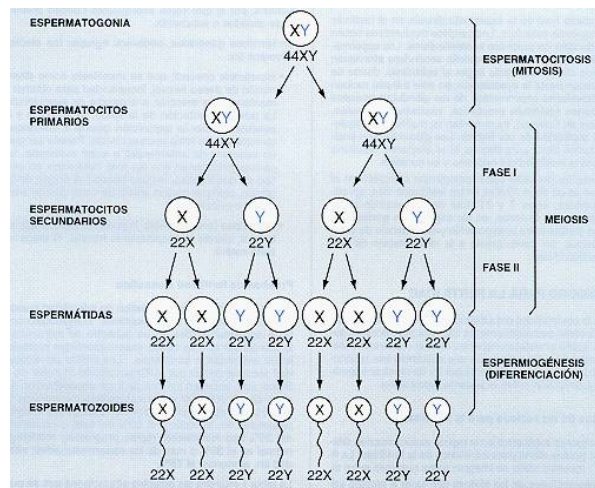


Fig. 1. Esquema de la espermatogénesis en el semental equino.

www.siafa.com.ar/notas/nota195/n441_02.jpg

III MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del área de estudio

El estudio de campo se elaboró en diferentes cuadras particulares localizadas en la región de la Comarca Lagunera, la cual está situada en la latitud 24° 22' Norte y 102° 22' Oeste de longitud, con 1,120 metros sobre el nivel del mar. Las cuales cuenta con poblaciones diferentes de animales. Y en cuanto al procesamiento de semen, se realizó en el laboratorio de reproducción animal de CEBIOREP perteneciente al departamento de producción animal de la UAAAN-UL.

Animales experimentales

El estudio de evaluación y congelamiento de semen fue en el periodo de febrero a junio del 2010, utilizando cinco sementales de diferentes razas y edades como donadores de semen, con un óptimo estado de salud, condición de peso corporal entre 500 – 700 kg, los sementales se mantuvieron alojados en caballerizas de 4 x 4 m, con piso de ladrillo, con un horario de alimentación de 7:00 am. y 7:00 pm., con agua a libre acceso. Cada semental fue registrado en una bitácora.



El formulario es un documento de registro con el título "CONTROL DE SEMENTALES U.A.A.A.N.-U.L." y un logo de un caballo en la parte superior izquierda. Incluye campos para registrar la fecha, el nombre del semental, el propietario, la edad, la raza, las señales artificiales, la función zootécnica, el volumen, las características, la concentración, la motilidad, el porcentaje de malformaciones, el número de dosis obtenidas, el número de canastilla termo y las observaciones.

Fig. 2. Bitácora para llevar el registro de cada caballo procesado.

Manejo de los animales

Para realizar la colección de semen se contó con una yegua en estro y se le colocó un tirapié para evitar accidentes, tanto para el operador como al semental.



Fig. 3: Yegua con tirapié para la seguridad del semental y operador.

Antes de la colección del semen se lavo el pene al garañón, exclusivamente con agua tibia, retirando el esmegma y otras suciedades que se encontraban en el prepucio, pene y glande y se dejo secar al aire libre.

Para la colección de semen se utilizo una vagina artificial modelo Universidad de Colorado (USA) que consta de un cuerpo rígido, una manga de látex, un recipiente colector de semen, un filtro, una válvula de presión, ligas y una camisa protectora del colector de semen. Ya armada la vagina artificial, se lleno con agua a una temperatura de 45°C y se estuvo monitoreando con un termómetro.



Fig. 4: Vagina artificial “Universidad de Colorado”, con todos sus aditamentos.

Ya teniendo la hembra y el semental, se sacó la vagina y se le colocó el lubricante a base de agua no espermicida en el interior.

El manejo de los sementales dependió del carácter, y respondieron a la voz del manejador, se requirieron por lo menos 3 personas, una manejó al semental, otro a la yegua y la tercera persona manipuló la vagina artificial.

Primero, se presentó el semental ante la yegua de frente y luego se le permitió acercarse para el cortejo. Pudiendo observar el espejeo en la yegua como signo específico de éstro.



Fig. 5 Presentación del semental ante la yegua para la estimulación del mismo.

En el garañón, los patrones más frecuentes consisten en olfatear y lamer a la yegua, en este caso, el semental mostró un signo conocido como flehmen, como se observa en la figura 6.



Fig. 6: Caballo mostrando la posición de flehmen al estar presente la yegua.

El garañón montó a la yegua, antes de la penetración el operador desvió el pene hacia la vagina artificial, sosteniéndola en un ángulo que más le agradó al semental, con el fin de tener mayor confort y estimulación sexual en el mismo.



Fig. 7. El garañón montando a la yegua para realizar la extracción.



Fig.8. Posición correcta del operador al hacer la recolección del semen.

Al ver que el garañón hizo el bandereo (movimiento de la cola de arriba hacia abajo) la vagina se retiró al momento en que el pene perdió su erección, procurando que permaneciera en posición casi vertical, para evitar pérdida de semen.

Manejo del semen en el laboratorio

Ya en el laboratorio se retiró el protector del colector de semen y el filtro, el volumen total del eyaculado libre de gel se registró en la bitácora y el semen se analizó macro y microscópicamente.



Fig. 9 Análisis del semen microscópicamente en el laboratorio.

Variables analizadas:

- Volumen del eyaculado
- Concentración
- Motilidad progresiva en fresco.
- Morfología.
- Motilidad progresiva posdescongelación.

Volumen

El volumen de eyaculado se evaluó en mililitros (ml) del vaso colector, sin embargo, hay que tomar en cuenta que, el volumen por sí mismo no posee correlación positiva con la fertilidad, pero se utiliza para calcular el número total de espermatozoides. El examen del color permite observar la presencia de sangre, orina o material purulento en el eyaculado.

Concentración

Para analizar la concentración espermática se realizó por medio de la cámara de Neubauer, utilizando formalina amortiguada, a una dilución de 1:200 de semen, en una pipeta de glóbulos rojos se lleno hasta 0.5 de semen y con formalina hasta 101, se homogenizo, después se tiraron las primeras gotas colocando la 4º gota en la cámara de Neubauer, se enfocó en la lente de mayor aumento, en este caso de 100x y se contaron todos los espermatozoides que tenían la cabeza dentro de los 4 cuadros de las esquinas y el del centro de la cámara.

Motilidad progresiva

La motilidad progresiva refleja la viabilidad de un eyaculado. Se realizó la estimación visual de la motilidad colocando una gota de semen puro entre porta y cubre objetos, colocándolo en la platina del microscopio óptico con el objetivo 100x. Se evaluó el porcentaje de motilidad progresiva de la muestra sin diluir y luego con el diluyente para la centrifugación (Cuadro 1) tomando como referencia la técnica de la escuela alemana, la motilidad progresiva debe de estar en un 70% con un rango de 60 a 95%.

Morfología

Para el examen morfológico se utilizó una tinción compuesta de eosina-nigrosina, después, se hizo un frotis con una gota de semen mezclada con el colorante, se dejó secar y se observó en el microscopio óptico con el objetivo 100x analizando diferentes campos, evaluando y contando de manera subjetiva cuántos de ellos eran normales y anormales.

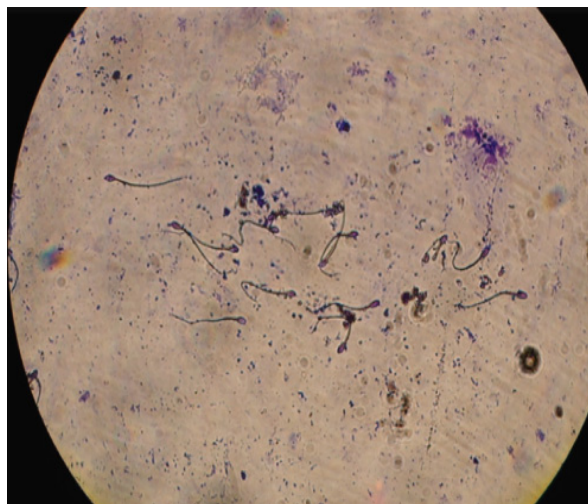


Figura 10. Conteo espermático evaluando malformaciones con tinción compuesta de eosina-nigrosina.

PRESERVACIÓN DEL SEMEN EQUINO

Después de la colecta, se retiró el filtro del vaso colector de semen donde quedó el gel de la eyaculación. Y se le agregó el diluyente de centrifugación con una relación 1:1 es decir, 1: de semen por 1: de solución para centrifugar (Cuadro 1).

Cuadro 1: Fórmula para la elaboración del diluyente para la centrifugación.

Ingredientes	Escuela alemana
Glucosa	59.985 g
Citrato de sodio	3.700 g
EDTA	3.699 g
Bicarbonato de sodio	1.200 g
Sulfato polimixina B	10 mil UI
Agua destilada c.b.p.	1 litro
Ph	6.59
mOsm/kl	409
Temperatura	36°

Ya diluido el semen, se colocó en tubos de ensayo de 10 ml, para después centrifugarlo a 400 gravedades (g) durante 15 minutos, con el fin de eliminar el plasma seminal.

Mientras se centrifugaba, se calculó el número de dosis y la cantidad de dilución que se agregaría para la congelación, esto se determinó con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Volumen} \times \text{concentración} \times \% \text{ motilidad} \times \% \text{ normalidades}}{\text{Concentración deseada por dosis}}$$

En este caso la concentración deseada en dosis de .5ml es = 200 millones de espermatozoides.

Posteriormente el centrifugado se separa el sobrenadante por decantación y se añadió la dilución de congelación de acuerdo el cálculo obtenido, para la elaboración del diluyente se necesitan los siguientes ingredientes:

Cuadro 2: Fórmula para la elaboración del diluyente de congelación.

Ingrediente	Cantidad
Diluyente de centrifugación	25 ml
Lactosa al 11%	50 ml
Glicerina	4 ml
Yema de huevo	20 ml
Pasta de Orvus	0.5 ml
Agua destilada	100 ml

Después de agregar el diluyente de congelación al semen, se evaluó nuevamente en el microscopio para verificar la motilidad, posteriormente se dosifico en pajillas de .5 ml y se sellaron con alcohol polivinilo.

Para la congelación, las pajillas se colocaron en una rejilla, sometiéndose en el vapor de nitrógeno (-140°C) a un espacio entre éste ultimo y las pajillas de 4 cm durante 11 minutos, posteriormente, se sumergieron por completo en el nitrógeno (-196°C). Se tomó una pajilla al azar, colocándola en agua a una temperatura de 37°C por 35 segundos, se extrajo y se seco correctamente, se corto de ambos lados para después verter una pequeña gota en un portaobjetos y encima de esta el cubreobjetos para evaluar la motilidad en el microscopio óptico, ya analizado, se procedió a colocarlos en cubiletes, estos en los bastones, identificando a estos últimos

con la fecha y el nombre del caballo, los bastones se almacenaron en las canastillas de los termos con nitrógeno.

IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuadro 3. Resultados de las variables a medir.

SEMENTAL	VOL.	CONC x ml.	MP	MORF.	MPD
Rodo	38 ml	170,000,000	85%	9%	55%
Alazán	35 ml	150,000,000	70%	10%	50%
Cazador	70 ml	300,00, 000	75%	8%	55%
Jack	40 ml	109,000,000	80%	6%	50%
Aniversario	80 ml	48,000,000	75%	8%	45%
Promedio	52.6 ml	155,400,000	73%	8.1%	51%

Donde:

VOL= Volumen libre de gel.

CONC x ml= Concentración por mililitro.

MP= Motilidad progresiva.

MORF= Morfología.

MPD= Motilidad pos descongelación.

Volumen del eyaculado

El volumen de eyaculado se hace sin tomar en cuenta el gel de la eyaculación, Jasko (1992) nos menciona que el volumen de un eyaculado no es un buen indicador de la fertilidad del semental, pero su medición es importante para estimar el número total de espermatozoides. Smith (2001) indica que el eyaculado de un caballo de 5 a 14 años de edad, varía entre 50 a 150 ml. De acuerdo con Jasko (1992) que considera normales los valores que fluctúen entre 20 y 150 ml de eyaculado libre de gel, en esta investigación, se obtuvieron los valores de 35 a 80 ml con un promedio de 56.25 ml. Boeta (2000) menciona que el volumen de eyaculado en burros tiene un promedio de 70 ml. Coincidiendo con Jasko (1992) los niveles de

eyaculado fueron bajos en algunos caballos y otros acercándose al promedio que menciona Boeta (2000).

Concentración espermática

Determinar la concentración espermática es importante, ya que es una característica muy variable Hafez (1987) y afecta directamente a la fertilidad del semental. La concentración espermática de los sementales oscilo entre 48 a 300 millones de espermatozoides por ml. Crump (1989) encontró un promedio de 120.5 millones de espermatozoides por ml, donde compara distintos métodos para la extracción del semen y Hafez (2000) menciona que la concentración por ml en equinos varia de 100 a 150 millones, estos resultados indican que la investigación realizada colocan a los sementales evaluados en un promedio aceptable ya que se obtuvo 155,400,000 espermatozoides por ml.

Motilidad

La motilidad progresiva en fresco obtenida entre los sementales fue relativa, con un promedio de 73%, coincidiendo con Zarco (2000) quien menciona una media de 75% con un rango de 60 a 95%. Marcando una diferencia de Cox (2005) quien encontró una motilidad progresiva de un 58.3 % en promedio.

Morfología

Boeta (2000) menciona que el promedio de morfologías aceptado es de 10% para anomalías primarias y de 20% para las anomalías secundarias. Los resultados mostraron una morfología satisfactoria ya que el promedio fue de un 8.2%. Lo que puede ser un indicio de que los

caballos de la Comarca Lagunera no se ven afectados respecto a las malformaciones espermáticas.

Motilidad pos descongelación

Para monitorear la calidad de semen en la Comarca Lagunera, se descongelaron las pajillas a una temperatura de 36°C, obteniendo una motilidad posdescongelación con un promedio de 51%. Esto coincide con los resultados promedio de Brinsko (2000) quien nos menciona un parámetro de 50% de motilidad progresiva en semen refrigerado.

Relacionando los resultados de otras especies, como carneros, con un promedio de 51.2% (Angulo, *et al* . 1999) y 45% (Brito *et al*, 2004) en cabras de 58 a 62% (Valencia, J . 1994) bovinos 40% (Catena, *et al* 1999) el semen equino mantiene una motilidad progresiva posdescongelado similar.

Estos resultados, indican que la técnica descrita en este estudio sirvió para mantener la calidad del semen aceptable y en ello lograr por mayor tiempo la criopreservación del semen de esta especie, lo que conlleva a una mayor facilidad para la utilización de I.A. con mayores ventajas.

V CONCLUSIONES

Analizando los resultados, se puede concluir que los métodos tradicionales de obtención seminal por vagina artificial, crioconservación y evaluación general del semen equino, se comporta de manera similar a lo reportado en la literatura, cuando se aplica en caballos explotados y manejados en condiciones climáticas de la Comarca Lagunera.

VI LITERATURA CITADA

Angulo M.R.B. Ortiz H.A. Berruecos V.J.M. Feldman S.D. Valencia M.J. 1999. Motilidad y fertilidad del semen de carnero descongelado a 2 diferentes ritmos de temperatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Veterinaria México vol. 30 pp. 265-268.

Araya JC. Tamayo C. Ossandon L. Rodriguez H. 2004. Morphology and immunohistochemistry of the human vas deferens. Rev. Chil. Technol. Med. Vol. 24 pp 1111-1117.

Boeta M. Zarco Q.L s/f. Utilización de leche descremada ultrapasteurizada como diluyente de semen refrigerado de burro, destinado a la inseminación de yeguas. Departamento de reproducción, facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia De la Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.

Boyle ms. 1992. Artificial insemination in the horses. Annales de Zootechnie. Vol. 41 pp 311-318.

Brinsko S., Varner DD, Blanchard TL. 2000. Transporte de semen equino. Department or Large Animal Medicine and Surgery, College of Veterinary Medicine, Texas A&M University, College Station, USA.

Brito F.I. Valencia M.J. Balcázar S.A. Angulo M.R. Mejia V.O. 2004. Congelación de semen de carnero en pellets con lo diluyentes tris-glucosa yema de huevo o lactosa-yema de huevo. Avances en la Investigación Agropecuaria. Vol. 8, No. 002, universidad de Colima México.

Catena M. Cabodevila J. 1999. Evaluación de semen bovino congelado. Fac. De Cs. Veterinarias. Univ. Nac. Del Centro de la Prov. De Bs. As. Campus Universitario Tandil.

Cole HH. Cupps PT. 1977. Reproduction in Domestic Animals. Third Edition. Editorial Academic Press New York. Pp 2003-224.

Cox LMAF. 2005. Caracterización andrológica de potros de raza chilota. Universidad Austral de Chile Facultad de Ciencias Veterinarias. Instituto de Reproducción Animal. Valdivia Chile.

Crump J. Crump J. 1988. Stallion ejaculation induced by manual stimulation of the penis. Journal of Theriogenology. Vol. 31, Iss 2, pp 341-346.

Dukes HH. Swenson ML. 1981. Fisiología de los animales domésticos, Tomo II, Funciones de Integración y Reproducción. Editorial Aguilar. Pp 1649-1696.

Galina, C. 2008. Reproducción de animales domésticos 3º Edición. Limusa. México. Pp 43-57.

Hafez ES, Hafez B. 2000. Reproducción e inseminación artificial en animales. Séptima edición. Editorial Mc Graw Hill. Pp 375-385.

Jasko DJ. 1992. Evaluation of stallion semen. Department of Clinical Sciences, Veterinary Teaching Hospital, Colorado State University College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences, Fort Collins. Vet. Clin North Am Equine Pract. Apr; 8(1): 129-48.

Losinno L. MV, PhD. 2008. Laboratorio de reproducción Equina, Cátedra de Producción Equina, Departamento de Producción Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, (5800) Río Cuarto, Argentina.

Mann T. 1975. Biochemistry of stallion semen J Reprod Fert, Vol. 23 pp 47-52. Morel MCD. 1999. Equine artificial insemination CABI Publishing New York p 406.

NORMA Oficial Mexicana NOM-127-ZOO-1995, Proceso zoonosanitario del semen de animales domésticos.

Smith H. 2001 Infertility in Stallions: evaluation of semen and sperm. Disponible en www.ctba.com/01magazine/dec01/HEATHERTHOMAS.pdf.

Valencia MJ, González HG, González GME, Trejo GA. 1994. Motilidad y daño acrosomal del semen caprino congelado en pajillas de 0.25 ml y 0.5 ml y descongelado a dos diferentes ritmos de temperatura. Vet. Méx., Vol. 25.

Zarco, L., Boeta, M. 2000. Reproducción Equina 2º edición. Academia de investigación de biología de la reproducción equina, A.C. UNAM. México. Pp 147 174.

www.uclm.es/profesorado/produccionanimal/AparatoRepr.pdf