

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”**

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



“MANEJO REPRODUCTIVO DEL SEMENTAL EQUINO”

POR

ARTURO ADOLFO TREJOS SOTO

MONOGRAFÍA

PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO
DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

JUNIO DEL 2009

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”**

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



“MANEJO REPRODUCTIVO DEL SEMENTAL EQUINO”

MONOGRAFÍA

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO
DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

ARTURO ADOLFO TREJOS SOTO

ASESOR

M.V.Z. EDMUNDO GUZMÁN RAMOS

VOCAL

M.C. JUAN LUIS MORALES

VOCAL

Dr. CARLOS LEYVA ORASMA

VOCAL SUPLENTE

M.C. JOSÉ LUIS SALDOVAL ELIAS

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”**

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

“MANEJO REPRODUCTIVO DEL SEMENTAL EQUINO”

MONOGRAFÍA

APROBADA POR EL COMITÉ

ASESOR



M.C. JUAN LUIS MORALES CRUZ

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



M.C. JOSÉ LUIS FRANCISCO SANDOVAL ELÍAS

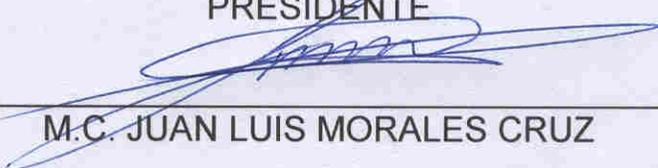
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”**

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

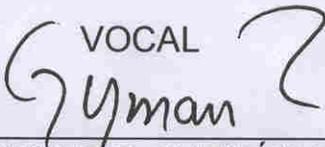
“MANEJO REPRODUCTIVO DEL SEMENTAL EQUINO”

PRESIDENTE



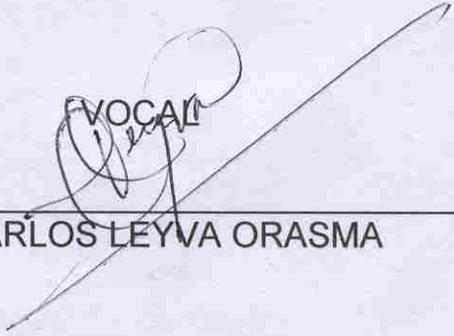
M.C. JUAN LUIS MORALES CRUZ

VOCAL



M.V.Z. EDMUNDO GUZMÁN RAMOS

VOCAL



Dr. CARLOS LEYVA ORASMA

VOCAL SUPLENTE



M.C. JOSÉ LUIS FRANCISCO SANDOVAL ELÍAS

Agradecimientos

A Dios, mi padre todopoderoso, que con su amor y protección, ha puesto los medios necesarios para salir adelante con mí más grande logro, mi familia, y hoy me ha permitido cosechar los frutos de muchos años de esfuerzo y sacrificio.

A mis padres y hermanos, por el apoyo incondicional que siempre he recibido de ellos, por que sé están presentes a pesar de la distancia, y por que me han demostrado que siempre van a estar cuando los necesite, sin cuestionar si lo merezco o no.

A los docentes involucrados en la realización de éste documento, en especial al M.V.Z. Edmundo Guzmán Ramos, que ha participado enormemente en mi formación como Médico Veterinario Zootecnista y a quien debo gran parte de mi experiencia práctica, sobre todo en la rama de los equinos. Y al MC Juan Luís Morales Cruz, por su paciencia y dedicación, durante la carrera y en especial en la realización de éste documento.

GRACIAS.

Dedicatoria

A mí compañera, amiga, colega y esposa: Francisca Aguirre Por que crees en mí, por tu amor, por tu infinita paciencia, por tu compañía, por tu consejo, tu dedicación, respeto y comprensión.

A mis hijos, por que son la fuente de inspiración que necesito cada día para superarme, por que junto con mi esposa me han enseñado lo que ninguna institución puede enseñarme, a amarlos sin Condición ni medida, gracias por estar conmigo.

Resumen

La presente monografía tiene como objetivo describir un panorama general acerca del adecuado manejo reproductivo que se realiza en la actualidad para el semental equino y las diferentes biotecnologías reproductivas utilizadas en el mejoramiento genético de esta especie.

El trabajo presenta una breve revisión acerca de la anatomía y fisiología del aparato reproductor del caballo, así como las generalidades del semen y el espermatozoide equino, hace una descripción del examen que se debe de realizar a cualquier macho equino que se destinó a la reproducción y detalla los métodos de recolección de semen que existen, así como la evaluación que se debe hacer de este; Describe a detalle los diferentes tipos de procesamiento y conservación del semen y por último hace una pequeña referencia a la técnica de inseminación artificial en esta especie.

PALABRAS CLAVE: Semental equino, Semen congelado, Semen refrigerado, Semen fresco, Vagina Artificial, Inseminación artificial,

INDICE DE CONTENIDO

Agradecimiento.....	I
Dedicatoria.....	li
Resumen.....	lii
Indice De Contenido.....	1
I Introducción.....	3
II Objetivos.....	4
III Aparato Reproductor Del Caballo.....	5
3.1 Testículos.....	5
3.2 Escroto.....	7
3.3 Cordon Espermático.....	8
3.4 Epidídimo.....	9
3.5 Conducto Deferente.....	11
3.6 Glandulas Sexuales Accesorias.....	11
3.6.1 Ampula.....	11
3.6.2 Vesículas Seminales.....	11
3.6.3 Próstata.....	12
3.6.4 Glandulas Bulbouretrales.....	12
3.7) Pene.....	12
3.8) Prepucio.....	13
IV El Semen Equino.....	14
4.1 Componentes Del Semen.....	14
4.2 Espermatogénesis.....	14
4.3 Espermatozoides Equinos.....	21
4.4 Anatomía Y Fisiología Del Espermatozoide.....	22
4.5) Metabolismo Del Espermatozoide.....	23
V Examen Reproductivo Del Semental.....	26
5.1 Nutrición.....	26
5.2 Ubicación.....	26
5.3 Ejercicio.....	27
5.4 Conducta Sexual.....	27
5.5 Monta Natural.....	28
5.6 Examen De La Salud Reproductiva.....	29
5.7 Examen De Los Órganos Genitales.....	30
VI Métodos De Recolección De Semen.....	32
6.1 Vagina Artificial (V.A).....	33
6.1.1 Instalaciones Para La Recolección Con V.A.....	34
6.1.2 Yegua En Celo Para La Recolección Con V.A.....	35
6.1.3 Maniquí Para La Recolección Con V.A.....	35
5.1.4 Recoleccion Del Semen Con V.A.....	36
6.2 Estimulacion Manual.....	38
6.3 Induccion Farmacológica Con Xilacina.....	38
VII Evaluacion Del Semen.....	38
7.1 Examen Macroscópico.....	40
7.1.1 Volumen.....	41
7.1.2 Aspecto.....	41

7.1.3 Ph.....	41
7.2 Examen Microscopico.....	41
7.2.1 Motilidad.....	42
7.2.2 Concentración	42
7.2.3 Número Total De Espermatozoides	43
7.2.4 Coloracion Supravital	44
7.2.5 Morfología Espermática	44
7.2.6 Test O Pruebas Funcionales.....	45
VIII Factores Que Afectan La Conservación Del Semen.....	46
8.1 Choque Térmico	46
8.2 Plasma Seminal.....	47
7.2.1 Centrifugación	49
8.3 Diluyentes	51
IX Procesamiento De Semen	52
9.1 Semen Fresco	52
9.2) Semen Refrigerado.....	54
9.2.1 Diluyentes Para Semen Refrigerado.....	54
9.2.2 Dilución, Volumen Y Dosis Utilizados Con Semen Refrigerado	57
9.2.3 Envase Del Semen Refrigerado.....	58
9.2.4 Refrigeración Para El Semen Refrigerado.....	61
9.2.5 Temperatura Y Tiempo De Almacenamiento Del Semen Refrigerado	62
9.2.6 Transporte Del Semen Refrigerado.....	62
9.2.7 Concepción Utilizando Semen Refrigerado.....	63
9.3 Semen Congelado	64
9.3.1 Principios De Crio Preservación.....	65
9.3.2 Diluyentes Para Semen Congelado	72
9.3.3 Dilución Y Dosis Inseminante Para Semen Congelado.....	74
9.3.4 Envase De Semen Congelado	75
9.3.5 Congelacion Del Semen.....	75
9.3.6 Descongelacion De Semen.....	76
9.3.7 Concepción Utilizando Semen Congelado	77
X Inseminacion Artificial	78
10.1 Selección De Yeguas.....	79
10.2 Momento De La Inseminación	79
10.3 Técnicas	81
10.3.1 Inseminación Artificial Con Control Manual.....	81
10.3.2 Inseminación Bajo Control Visual.....	82
XI Conclusiones	84
XII) Literatura Citada	85

I INTRODUCCIÓN

En la equinotécnica actual, la reproducción ha avanzado enormemente, sobre todo desde que disminuyeron significativamente las restricciones y prohibiciones impuestas por las asociaciones de criadores de la mayoría de las razas equinas, como lo son el uso de prácticas biotecnológicas como la inseminación artificial y trasplante de embriones.

Este gran avance nos ha obligado a prestarle más atención al semental equino o “grañarón”, que había sido utilizado solamente para la monta natural y por lo general no llevaba ninguna evaluación de su eficiencia reproductiva.

Actualmente en cualquier programa reproductivo es indispensable llevar un control detallado de factores que se refieren al semental, como lo son: la nutrición, el ejercicio, la función zootécnica, conducta sexual, exámen de salud reproductiva, exámen de los órganos genitales, entre otros (Boyle, 1992).

Dentro de las prácticas mas importantes que se llevan a cabo en el manejo reproductivo del semental equino, están el procesamiento y preservación del semen. Práctica que se ha convertido, además de una técnica muy viable, en una actividad económica sumamente fuerte, permitiendo esto que en el procesamiento y preservación del semen junto con la inseminación artificial exista un alto grado de especialización en esta rama.

II OBJETIVOS

Objetivo General:

El presente documento tiene el objetivo de recopilar la información mas actualizada, concerniente al adecuado manejo reproductivo del semental equino.

Objetivo Espesífico:

Revisar las diferentes biotecnologías reproductivas utilizadas en esta especie, en el mejoramiento genético de la misma.

III APARATO REPRODUCTOR DEL CABALLO

Para realizar la evaluación de la capacidad reproductiva del semental, así como para el desarrollo de procedimientos de manejo artificial de la reproducción, tales como la colección de semen es indispensable tener conocimiento de la anatomía de sus órganos genitales. Este conocimiento también es útil Para diagnosticar condiciones reproductivas anormales en el garañón. Para su estudio, los órganos genitales del macho se dividen en: testículos, escroto, cordón espermático, epidídimo, glándulas sexuales accesorias (ámpulas, vesículas seminales, próstata y glándulas bulbouretrales), prepucio y pene (Palma 2008).

3.1 TESTÍCULOS

Son los órganos sexuales primarios del macho, ya que en ellos se producen los gametos masculinos (espermatozoides), además de ser el sitio de producción y síntesis de andrógenos (hormonas que estimulan el desarrollo de los caracteres sexuales masculinos.). Los testículos se localizan en la región inguinal, recubiertos por el escroto. En el equino el eje longitudinal mayor es horizontal. En caballos Pura Sangre Inglés los testículos miden aproximadamente 10 a 12 cm. de largo, 5 cm. de ancho, y 6 a 7 cm. de altura. Cada testículo representa dos bordes, dos caras y dos extremidades, las caras medial y lateral son convexas y lisas (Zarco 2000).

El tamaño testicular varía de acuerdo a la edad del animal, época del año y raza. Además existen variaciones individuales. Los testículos son más grandes y activos durante la época reproductiva, alcanzando su máximo durante los meses en que el fotoperíodo es mas largo (mayo a julio). A partir de agosto la actividad testicular se reduce, lo que puede resultar en menores concentraciones de testosterona circulante y en menor producción total de espermatozoides 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. El parénquima del testículo está constituido por túbulos seminíferos (donde se producen los espermatozoides) y por tejido intersticial. (Galina 2008)

Cada túbulo está formado por un área convolucionada, que es donde se producen los espermatozoides. Donde el área convolucionada termina, se convierte en un tubo recto que desemboca en la rete testis. Los tubos de la rete testis se van fusionando hasta formar 13 a 15 conductos eferentes que desembocan en el conducto del epidídimo. El color del parénquima testicular va cambiando con la edad, siendo de un color claro en animales jóvenes, y se va obscureciendo conforme avanza la edad del animal (Morel 1999).

El tejido parenquimatoso del testículo está contenido dentro de una cápsula, llamada túnica albugínea, la cual está compuesta de tejido fibroso blanco y fibras musculares lisas. De las fibras de la túnica albugínea y tejido conectivo parten trabéculas, que pasan al interior de la gónada y subdividen al parénquima en lóbulos. 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. Externamente a la túnica vaginal propia, los testículos están cubiertos por una capa visceral que es una extensión del peritoneo, y que corresponde a la túnica vaginal común (Galina 2008).

La unidad funcional del testículo es el túbulo seminífero. Cada túbulo seminífero está constituido por tejido germinal, que es el que da origen a los espermatozoides y está constituido por diferentes tipos de células germinales; y por tejido sustentacular, formado por las células de Sertoli. El túbulo seminífero está rodeado por una lámina propia formada por fibroblastos, células mioideas y el proteoglicano laminina. Las células mioideas tienen la función de impulsar el avance de los espermatozoides a lo largo del túbulo conforme son producidos. Aparentemente las contracciones rítmicas de las células mioideas son estimuladas por oxitocina producida por las células de Leydig (Boyle 1992).

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 como barrera hemato-testicular. Debido a ella, las células del túbulo seminífero quedan aisladas del sistema

inmune. Este aislamiento es necesario porque los diferentes tipos de células germinales presentes en el animal adulto (espermatogonias A, B, espermatoцитos primarios y secundarios, espermátidas y espermatozoides) solamente se producen a partir de la pubertad y no existen durante la vida fetal, que es cuando el sistema inmune realiza un inventario antigénico para reconocer como propios los antígenos que en ese momento se encuentran presentes. De esta manera, en el animal adulto el interior del túbulo seminífero debe estar separado de la sangre para evitar un rechazo inmunológico (Galina 2008).

Al nacer el animal, las células germinales están constituidas exclusivamente por espermatogonias de reserva, las cuales eventualmente sufren mitosis para mantener una población estable. A partir de la pubertad se inicia la espermatogénesis, durante la cual las células sufren varias divisiones, tanto meióticas como mitóticas con cada división las células se van diferenciando hasta finalmente formar los espermatozoides (Zarco 2000).

El tejido parenquimatoso localizado por fuera de la lámina basal de los túbulos seminíferos se denomina tejido intersticial. Este tejido está constituido por tejido conectivo, vasos sanguíneos, vasos linfáticos y nervios. Un constituyente sumamente importante del tejido intersticial son las células de Leydig o intersticiales, que constituyen el principal componente esteroidogénico del testículo (Galina, 2008).

3.2 ESCROTO

El escroto es un órgano especializado que permite el funcionamiento normal de los testículos, para lo cual actúa como órgano termorregulador. Está formado por dos bolsas cutáneas que contienen a los testículos y las partes adyacentes al cordón espermático. Presenta una forma globular asimétrica, ya que por lo general el testículo izquierdo es más grande y menos movable que el derecho. En el escroto puede estar presente una pequeña cantidad de fluido, el cual permite el movimiento normal de los testículos. El escroto está formado por varias capas, que de fuera hacia adentro son:

- a) La piel, que es delgada y elástica, generalmente de color oscuro o negro, lisa. Presenta pelos finos y diseminados, también están presentes glándulas sebáceas y una gran cantidad de glándulas sudoríparas. Estas últimas son importantes por su contribución en la pérdida de calor por el testículo. Entre ambos testículos se encuentran un rafe escrotal longitudinal, que se continúa por delante con el prepucio y por detrás con el perineo.
- b) Dartos, de color rojizo e íntimamente adherido a la piel, excepto en la parte superior. Está constituido por tejido fibroelástico y fibras musculares lisas. A lo largo del rafe se forma un tabique que parte en dos bolsas al escroto, separando a los dos testículos. Al contraerse o relajarse las fibras del músculo liso del dartos, los testículos son acercados o alejados del cuerpo, con lo cual el dartos participa en la termorregulación del testículo.
- c) Fascia escrotal, que se deriva aparentemente de los músculos oblicuos abdominales y está constituida principalmente por tejido conectivo laxo.
- d) Capa parietal de la túnica vaginal, que contiene vasos y nervios (Galina, 2008).

3.3 CORDON ESPERMÁTICO

Está formado por tejidos de diversos tipos, que son arrastrados por el testículo a su paso desde la cavidad abdominal hasta el escroto a través del canal inguinal. El cordón espermático empieza en el anillo inguinal abdominal, donde las estructuras que lo constituyen se unen; 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, músculo cremaster interno, y la capa visceral de la túnica vaginal. La arteria espermática se enrolla alrededor de la vena espermática, formando el plexo pampiniforme, que junto con el músculo cremaster forma el sistema para la regulación de la temperatura testicular (Galina, 2008).

El cordón espermático al abandonar al testículo cráneo-dorsalmente entra al anillo inguinal externo, penetrando a la cavidad abdominal a través del anillo inguinal interno. Para diagnosticar hernias se palpan tanto el escroto como los anillos inguinales interno y externo (Galina, 2008).

3.4 EPIDÍDIMO

El canal del epidídimo es la continuación de los conductos eferentes. Cada epidídimo está constituido por un solo conducto de hasta 45 metros de longitud, pero que tiene múltiples convoluciones, de tal forma que ocupa pocos centímetros. El epidídimo se adhiere al borde de inserción del testículo, y corre a lo largo de la cara externa del mismo. El epidídimo se divide anatómicamente en tres partes: la cabeza, el cuerpo y la cola. La cabeza del epidídimo se localiza anteriormente al testículo y está adherida a éste por medio de los conductos eferentes, tejido conectivo y la membrana serosa. El cuerpo del epidídimo descansa dorsolateralmente al testículo, al que se une por tejido seroso que forma lateralmente un saco llamado seno del epidídimo. La cola del epidídimo se localiza posteriormente, y esta unida al testículo por su ligamento propio. La cola del epidídimo se continúa con el conducto deferente (Zarco 2000).

Las funciones del epidídimo incluyen el transporte, almacenamiento, maduración y concentración de los espermatozoides. En los segmentos iniciales del epidídimo se reabsorbe la mayor parte del fluido testicular, así como proteínas y algunas otras sustancias. Los segmentos intermedios secretan sustancias involucradas en la maduración de los espermatozoides (Boyle 1992).

La maduración de los espermatozoides se adquiere gradualmente, conforme son expuestos a fluidos con diferente composición al avanzar a través de los diferentes segmentos del epidídimo. Esta maduración es indispensable para que los espermatozoides adquieran la capacidad fertilizante, razón por la cual los espermatozoides de la cabeza del epidídimo son infértiles, mientras que los que ya han llegado a la cola del epidídimo tienen la capacidad de fertilizar (Galina 2008)

Las funciones del epidídimo están reguladas hormonalmente, diversas hormonas esteroideas secretadas por el testículo y contenidas en el líquido testicular que llega al epidídimo pueden estar involucradas en la regulación de la función de este órgano. Los movimientos peristálticos de éste órgano son los responsables del paso de los espermatozoides a través del epidídimo. Los espermatozoides están inmóviles dentro del epidídimo, por lo que no pueden utilizar movimientos propios para transportarse (Morel 1999)

La velocidad de transporte de los espermatozoides a través de la cabeza y cuerpo del epidídimo no es afectada por el número de eyaculaciones. Por esta razón, si un garañón es utilizado con demasiada frecuencia no se produce un aumento en el porcentaje de espermatozoides inmaduros en el eyaculado. Lo que si ocurre es que disminuye la concentración de espermatozoides en cada eyaculado, y esto puede resultar en infertilidad, sin embargo, esto solo ocurriría si el semental es utilizado varias veces al día (Zarco 2000)

La cola del epidídimo es el sitio de almacenamiento de espermatozoides maduros. Entre las colas de los dos epidídimos de un garañón adulto puede haber 54 mil millones de espermatozoides, los cuales son suficientes para varias eyaculaciones. La velocidad de paso de los espermatozoides a través de la cola del epidídimo se ve afectada por la actividad sexual (Galina, 2008).

En un garañón en reposo sexual, los espermatozoides permanecen hasta diez días en dicha región, mientras que un animal sexualmente activo el intervalo puede reducirse a 7 u 8 días. Los espermatozoides que no son eliminados en el eyaculado son descargados gradualmente hacia la uretra para ser eliminados con la orina. Los espermatozoides no utilizados no pueden permanecer indefinidamente en la cola del epidídimo (Galina, 2008).

3.5 CONDUCTO DEFERENTE

Es un tubo que se extiende desde la cola del epidídimo hasta la porción pelviana de la uretra; a través de él pasan los espermatozoides durante la eyaculación. El conducto deferente del equino tiene una gruesa capa muscular, por lo que puede ser fácilmente palpado a través de la piel del escroto. Las contracciones de dicha capa muscular son importantes para impulsar el semen durante la eyaculación (Galina, 2008).

3.6 GLANDULAS SEXUALES ACCESORIAS

Las glándulas sexuales accesorias del garañón son: ámpula, vesículas seminales, próstata y glándulas bulbouretrales. La mayor parte del volumen del eyaculado está dado por las secreciones de las glándulas sexuales accesorias. Los espermatozoides de la cola del epidídimo son inmóviles, mientras que los espermatozoides presentes en el semen recién eyaculado muestran vigorosa motilidad. Esto se debe a que son activados al mezclarse en la uretra con las secreciones de las glándulas accesorias (Boyle 1992).

3.6.1 AMPULA

Poco antes de llegar a la uretra el conducto deferente forma un ensanchamiento fusiforme llamado ámpula, la cual es una estructura tubular de aproximadamente 0.7 a 2.0 cm. de diámetro. El ensanchamiento se debe a un engrosamiento de la pared que resulta de la presencia de numerosas glándulas (Boyle 1992).

3.6.2 VESÍCULAS SEMINALES

Son dos sacos elongados y piriformes que se localizan lateralmente a las ámpulas y a la parte posterior de la cara dorsal de la vejiga. Las vesículas seminales se encuentran dentro del pliegue genital y se relacionan dorsalmente con el recto. En el semental miden aproximadamente de 15 a 20 cm. de longitud, y su diámetro mayor es de 5 cm. Producen voluminosas secreciones que al momento de la eyaculación son vaciadas hacia la uretra, donde se unen a los espermatozoides provenientes del epidídimo y a la secreción prostática y de las glándulas bulbouretrales para formar el semen (Galina 2008).

El nombre de “vesícula seminal” puede sugerir la idea errónea de que estos órganos almacenan espermatozoides. Por esta razón algunos autores han comenzado a llamarles “glándulas vesiculares”. La función de las vesículas seminales es dependiente de la testosterona, por lo que las secreciones son más abundantes durante la estación reproductiva que durante el otoño o el invierno. Las vesículas seminales secretan un fluido gelatinoso (Boyle 1992).

3.6.3 PRÓSTATA

Es una glándula lobulada que se encuentra sobre el cuello de la vejiga y el principio de la uretra, por debajo del recto. Consta de dos lóbulos laterales y un istmo que los conecta. 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 una porción importante del fluido del eyaculado (Zarco 2000).

3.6.4 GLANDULAS BULBOURETRALES

Son dos glándulas que se sitúan a cada lado de la porción pelviana de la uretra, muy cerca del arco isquiático. Están cubiertas por el músculo uretral. Son de forma ovoide, aplanadas dorsoventralmente, y sus ejes mayores se dirigen oblicuamente hacia adelante y hacia fuera. En el semental pueden medir cerca de 4 cm. de longitud y aproximadamente 2.5 cm. de ancho. En el caballo castrado tienen tamaño de avellana. Sus secreciones contribuyen con una pequeña porción del eyaculado (Galina, 2008)..

3.7) PENE

El pene es el órgano copulatorio del macho. En el equino está constituido por una raíz, un cuerpo y un glande. La raíz del pene se inserta en las partes laterales del arco isquiático. La uretra pelviana pasa por encima del arco isquiático y continúa hacia delante para incorporarse al pene. El cuerpo del pene constituye la parte más importante del órgano, se inserta en la sínfisis isquiática a través de los ligamentos suspensorios del pene. El cuerpo del pene está formado por la uretra peneana, el cuerpo cavernoso de la uretra y el

cuerpo cavernoso del pene. El pene en reposo mide cerca de 50 cm., de los cuales 15 o 20 cm. corresponden a la porción libre del prepucio, mientras que el pene erecto puede llegar a medir hasta 100 cm. o mas (Zarco 2000).

El pene del gargañón está compuesto principalmente por tejido eréctil, el cual esta organizado en el cuerpo cavernoso del pene, el cuerpo cavernoso de la uretra y el cuerpo esponjoso del pene. El pene del gargañón es de tipo vascular, por lo que la erección depende de la acumulación de sangre en un sistema de senos venosos. Al acumularse la sangre, el órgano aumenta de tamaño. La erección es iniciada por estímulos visuales que llegan al cerebro, donde se procesa la información y se originan impulsos parasimpáticos que son más poderosos que los impulsos simpáticos que normalmente mantienen a las arteriolas del pene contraídas. 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, produciéndose una congestión de los cuerpos cavernosos. La erección termina al relajarse los músculos isquiocavernoso y bulboesponjoso y al contraerse las arteriolas del pene por impulsos simpáticos (Galina 2008)

El glande del pene es la extremidad libre y ensanchada del órgano. La base está rodeada por un borde circundante llamado corona del glande, la superficie es convexa en su porción inferior y presenta una depresión que da origen a la fosa del glande, a partir de la cual la uretra forma una prolongación de cerca de 2.5 cm. de longitud llamada prolongación uretral (Galina, 2008).

3.8) PREPUCIO

Es una invaginación doble de la piel que contiene y cubre la porción libre o preescrotal del pene cuando no está en erección. Consta de una parte externa y una interna. La externa también llamada vaina se extiende desde el escroto hasta 5 u 8 cm. del ombligo (Zarco, 2000).

IV EL SEMEN EQUINO

4.1 COMPONENTES DEL SEMEN

El semen tiene 2 componentes principales, los espermatozoides y el plasma seminal. El eyaculado equino está compuesto por diversas fracciones. La pre-secreción, cuya eliminación puede ser observada del pene del semental cuando se realiza el salto o en el período de máxima excitación. Tiene la función de limpiar y lubricar la uretra, que es rica en NaCl. La fracción rica en espermatozoides contiene de 80 a 90% de espermatozoides y componentes bioquímicos. Es eliminada en las primeras 2 a 3 fases de las 6 a 9 en que se compone el eyaculado. Esta fracción contiene también ergotamina y glicerilfosforilcolina. La fracción pobre o fracción gel producida por las vesículas seminales posee baja concentración de espermatozoides, y es rica en ácido cítrico y potasio. Su volumen es variable, depende de la época del año, la edad del reproductor y la frecuencia de extracción de semen. La última fracción post-coito, es una secreción acuosa de poco volumen (Mann, 1975).

El plasma seminal, secretado por las glándulas sexuales accesorias, sirve de sustrato para los espermatozoides. Algunos de sus componentes permiten e inician la maduración de los espermatozoides. El plasma seminal es una fuente de energía a través de la glucosa, el azúcar mas glicosilable del semen equino. Se encuentra en concentraciones mayores en el macho equino que en suinos y bovinos (Mann, 1964). Además de esto protege a los espermatozoides de las fluctuaciones osmóticas, previene la oxidación de otros componentes químicos y actúa como agente de coagulación (Morel, 1999).

4.2 ESPERMATOGÉNESIS

Es el proceso de gametogénesis en el macho. Las células germinales masculinas y femeninas tienen el mismo origen embrionario. Las gónadas indiferenciadas en un embrión tienen tres tipos celulares:

- a) Las células que van a originar los gametos (ovogonia o espermatogonia)
- b) Precursoras de células que nutren a los gametos en desarrollo (células de la granulosa en el ovario; células de Sertoli en el testículo)

c) Precursoras de células que secretan hormonas sexuales (células tecaes en el ovario; células de Leydig en el testículo) (Galina, 2008).

Las células germinales son las únicas estructuradas en el organismo que poseen la capacidad de dividirse por meiosis sufriendo una reducción en el número de cromosomas, siendo responsables por la transmisión de la carga genética a los descendientes. En contraste, las células somáticas solamente se dividen por mitosis (Zarco 2000).

La formación de los gametos comprende fases secuenciales de mitosis, meiosis y postmeiosis. Estos procesos son altamente organizados y necesitan un preciso y bien coordinado programa de expresión genética. Una de las características importantes de la gametogénesis es la reducción cromosómica, que a través de la meiosis, reduce por la mitad el número de cromosomas y además produce células distintas entre sí, debido a cambios de material genético entre los pares de cromosomas provenientes del padre y la madre, lo que ocurre en el proceso de “crossing over” durante la primera fase de la meiosis (Galina, 2008).

En el nacimiento, las células germinativas de los machos se llaman gonocitos. Los túbulos seminíferos son pequeños y no tienen lumen; la población celular está compuesta apenas por los gonocitos y células de soporte que darán origen a las células de Sertoli. Los túbulos se encuentran rodeados por gran cantidad de tejido intersticial que contiene principalmente células mesenquimales precursoras de las células de Leydig. Cuando la diferenciación celular empieza a manifestarse, ocurre la formación del lumen del tubo seminífero (Morel 1999)

Antes de la pubertad, la diferenciación celular se manifiesta primero por la presencia de espermatoцитos primarios, los cuales se degeneran en la fase de paquitenio, por falta de estímulo hormonal. 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 a dar origen a las células de Leydig (Zarco 2000).

La población de células de Sertoli se define durante la última fase de la gestación y después del nacimiento, siendo controlada principalmente por los niveles de la hormona folículo estimulante (FSH). Este patrón de multiplicación produce una población fija en tamaño después de la pubertad y cuantitativamente estable durante toda la vida del animal, existiendo aún una relación directa entre el tamaño de la población total de células de Sertoli y la producción de un adecuado número de espermatozoides en la vida adulta. Las células de Sertoli son las únicas células somáticas que están en el epitelio seminífero y su función es la nutrición, sustentación y control endocrino de las células germinales. Las células de Sertoli participan activamente en el proceso de liberación de los espermatozoides para la luz del túbulo. En este momento las células de Sertoli realizan la fagocitosis de parte del citoplasma del espermatozoide de los llamados cuerpos residuales. Las células de Sertoli también fagocitan las células germinales que se degeneran en el curso normal de la espermatogénesis (Galina 2008).

Las células peritubulares o mioides están situadas alrededor del túbulo seminífero, y se piensa que estas células promueven la contracción y la integridad estructural del túbulo. Este tipo celular apenas se diferencia en la pubertad por la acción de los andrógenos. Las interacciones entre las células de Sertoli y las células mioides parecen tener un papel importante en el mantenimiento de las funciones del testículo (Zarco 2000).

Las células de Sertoli sintetizan gran cantidad de proteínas, como por ejemplo las proteínas ABP (androgen binding protein), que transportan andrógenos para todo el aparato reproductivo, transferrinas, que transportan hierro para la respiración celular de las células germinativas, y también las inhibidas, que regulan la liberación de FSH por la hipófisis, a través de un sistema de retroalimentación negativa (Galina, 2008).

Este mismo autor explica que, las espermatogonias A0 son la fuente para la continua producción de gametos. La mitad de ellas se dividen y forman células iguales (las llamadas células tronco) y aproximadamente la otra mitad forma espermatogonias A1, que nuevamente por divisiones mitóticas forman espermatogonias A2, A3 y A4. El tipo A4 sufre mitosis para formar la

espermatogonia intermedia (A In), que a su vez, por mitosis, forma la espermatogonia B. Estos tipos de espermatogonias pueden ser identificados en evaluaciones histológicas de acuerdo con su organización topográfica en la membrana basal de los túbulos seminíferos o su contenido de heterocromatina. Otra manera de diferenciación se basa en marcadores moleculares específicos que distinguen las espermatogonias tronco (A0) de las demás espermatogonias, con los fines de aislamiento, desarrollo In Vitro y trasplante.

El mismo autor postula que, las espermatogonias B pasan por mitosis para formar los espermatocitos primarios; estos inician la primera etapa de la meiosis para dar lugar a los espermatocitos secundarios; en la segunda etapa de la división meiótica, cada espermatocito secundario se divide para formar las espermátidas. Cuando el testículo alcanza su desarrollo total, la meiosis se completa y las espermátidas originadas se convierten en espermatozoides. Uno de los signos característicos de este fenómeno es el alargamiento de las espermátidas y su migración hacia el lumen del.

Para su estudio, Galina divide la espermatogénesis en tres fases basadas en consideraciones funcionales:

1. *La fase proliferativa.* Después de la pubertad y durante la vida reproductiva del macho, las espermatogonias se dividen de una manera rápida y sucesiva por mitosis: tipo A0 (células tronco), las A1-A4, las intermedias y las de tipo B. Todas ellas representan estadios sucesivos del desarrollo de la espermatogonia.
2. *La fase meiótica.* El material genético se recombina y es segregado. El espermatocito primario realiza su primera división meiótica o reduccional para dar origen a los espermatocitos secundarios. Ésta es una fase prolongada donde ocurren los cambios de material genético entre los pares de cromosomas. Las fases de esta división son iguales a las que ocurren en la meiosis de la hembra. Durante este período no sólo se realiza la reducción en el número de cromosomas somáticos, sino que también los cromosomas sexuales se separan de manera que un espermatocito secundario recibe el cromosoma X y el otro el cromosoma Y. en la segunda

división meiótica de cada espermatocito secundario se producen dos espermátidas.

3. *La fase de diferenciación o fase espermiogénica.* Consiste en la transformación de las espermátidas en espermatozoides estructuralmente equipados para fertilizar al óvulo. Estos son cambios que ocurren cuando las espermátidas están en contacto con el citoplasma de la célula de Sertoli. Durante este proceso comienzan a diferenciarse las partes que constituyen el espermatozoide, primero la cabeza (formada casi exclusivamente por el núcleo), el acrosoma o capucho cefálico, el cuello y la cola (que es la porción motriz del espermatozoide) (Galina, 2008).

La testosterona, hormona esteroide producida por las células de Leydig, es esencial para el mantenimiento y la restauración de la espermatogénesis, y para desarrollar y mantener las características secundarias masculinas. La acción de la FSH está más enfocada en las fases gestacional, prepuberal y puberal, donde se desarrolla la espermatogénesis. Por ejemplo, en el animal adulto los niveles basales de FSH son suficientes para mantener la función espermatogénica normal. Sin embargo, la FSH interactúa con los receptores de las células de Sertoli estimulando la producción de ABP e inhibina, y también la división de las células germinales. La inhibina, actúa bloqueando la liberación de FSH y estimulando la liberación de LH (Zarco 2000).

La hormona LH actúa en el testículo estimulando la secreción de andrógenos por las células de Leydig, y por ende estimula la proliferación del epitelio seminífero, ya que existen receptores para estos esteroides en las células germinales. Los andrógenos son transportados desde el espacio intersticial para el epitelio seminífero y también para todo el aparato reproductivo por proteínas transportadoras de andrógenos (ABP) producidas por las células de Sertoli (Boyle 1992).

Está bien establecido que el control de la espermatogénesis depende de la función del eje hipotálamo-hipófisis-testicular. Sin embargo, muchos estudios indican la importancia de la regulación de la espermatogénesis a nivel parácrino-autócrino, o sea, a nivel local (Zarco 2000)

Este mismo autor postula que, aunque la FSH aumente la viabilidad del epitelio seminífero y la proliferación de las espermatogonias, y los andrógenos sean esenciales para la diferenciación del aparato reproductivo masculino, no son suficientes para inducir el desarrollo normal de la espermatogénesis. El desarrollo de la función testicular requiere también de una producción de factores locales y una interacción de célula a célula que regula el crecimiento y la diferenciación del tejido.

Los factores locales envueltos en las interacciones entre células de Sertoli, de Leydig y germinativas incluyen *insulin growth factor 1* (IFG-1), inhibina, *transforming growth factor β* (TGF- β), oxitocina, vasopresina, opioide, esteroides, citocinas (interleucinas 1 y 6, y el factor inhibidor de migración de macrófagos- MIF). Estas citocinas son producidas por las células de Sertoli, células germinativas, macrófagos y células de Leydig, y actúan en la modulación de la espermatogénesis (Galina, 2008).

En algunas especies, incluyendo en el hombre, los macrófagos representan el segundo tipo celular intersticial más numeroso en el testículo, después de las células de Leydig. Macrófagos y varios subtipos de linfocitos son identificados en los testículos de carneros y ratones. Los macrófagos están en íntima asociación con las células de Leydig y actúan juntos en la regulación de la esteroidogénesis (Boyle 1992).

La espermatogénesis empieza en la pubertad. De un espermatocito primario se producen teóricamente cuatro espermatozoides. Una vez que se inicia la espermatogénesis en el macho, a cada ciclo del epitelio seminífero las células germinales son renovadas, manteniendo la provisión para toda la vida reproductiva. La meiosis durante su transcurso es ininterrumpido (Galina, 2008).

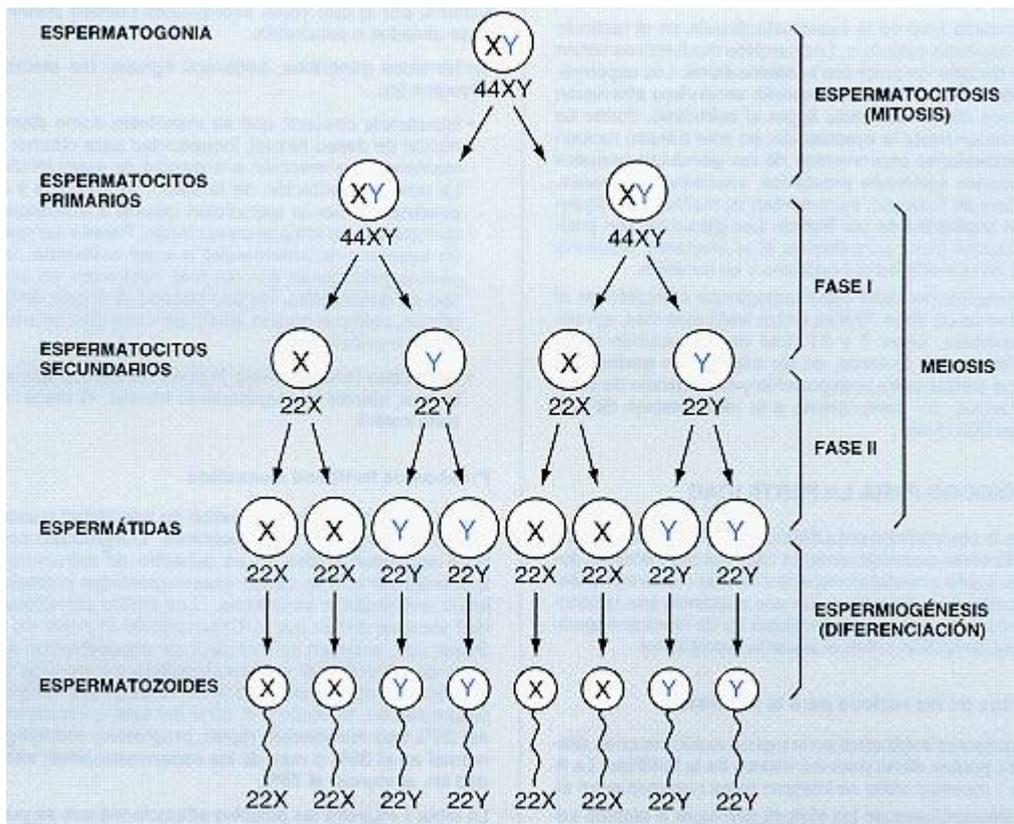


Fig. 1: Espermatogénesis.

http://www.jmcprl.net/NTPs/%40Datos/ntp_441_archivos/n441_02.jpe

Al iniciarse el proceso de espermatogénesis algunas espermatogonias de reserva sufren algún tipo de división asimétrica mediante la cual forman otra espermatogonia de reserva y una espermatogonia tipo A1. A partir de este momento se inicia la espermatogénesis, la cual para su estudio se divide en tres fases: espermatocitogénesis, meiosis y espermiogénesis. La espermatogénesis en el equino dura 57 días, de los cuales 19.4 corresponden a la espermatocitogénesis, 19.4 a la meiosis, y 18.6 a la espermiogénesis (Zarco, 2000).

El mismo autor define y explica la espermatocitogénesis como el proceso mediante el cual una espermatogonia tipo A1 sufre una cadena de divisiones mitóticas. Primero sufre 4 divisiones mitóticas, mediante las cuales forma 8 espermatogonias A1 que se mantienen unidas entre sí por puentes citoplasmáticos. Posteriormente las espermatogonias A1 continúan sufriendo divisiones, en cada una de las cuales las células hijas se van diferenciando, formando sucesivamente espermatogonias tipo A2, A3, B1 y B2, y finalmente espermatocitos primarios. Durante todo este proceso y durante el resto de la

espermatogénesis, las células hijas restantes de cada división se mantienen unidas a sus hermanas mediante puentes citoplasmáticos. De esta manera todas las descendientes de una espermatogonia A1 forman una clona, en la cual las divisiones celulares van ocurriendo en forma sincronizada.

Una vez que se forman los espermatoцитos primarios se inicia la meiosis. Durante la primera división meiotica los espermatoцитos primarios dan origen a espermatoцитos secundarios, los cuales sufren la segunda división meiótica para formar espermátidas (Galina, 2008).

Las espermátidas ya no vuelven a dividirse, si no que se transforman gradualmente en espermatozoides mediante un proceso de metamorfosis, conocido como espermiogénesis. Durante la espermiogéneisis, las células de Sertoli mantienen un estrecho contacto con las espermátidas, guiándolas y regulándolas durante su transformación de espermátidas esféricas hasta espermatozoides. El proceso mediante el cual las células de Sertoli finalmente liberan a los espermatozoides hacia la luz del túbulo seminífero se conoce como espermiación. Durante el proceso de espermiogénesis la espermátida se deshace de la mayor parte del citoplasma el cual es eliminado en forma de cuerpos residuales, los cuales son fagocitados por las células de Sertoli. También las células germinales que mueren durante la espermatogénesis son fagocitados por las células de Sertoli (Zarco, 2000)

4.3 ESPERMATOZOIDEOS EQUINOS

Son células haploides con la única función de fecundación. Para llevarla a cabo, las células espermáticas tienen que iniciar y mantener el metabolismo para producir energía, la motilidad progresiva y las enzimas esenciales acrosomales para penetrar a través de las estructuras que envuelven al ovocito (Amann y Graham, 1993).

También es necesaria una adecuada distribución de lípidos en la membrana plasmática y el acrosoma, las cuales estabilizan esas estructuras hasta el momento de la fecundación y permiten también la fusión de las membranas en el momento apropiado. Además de esto, el mantenimiento de

las proteínas de la membrana plasmática, es esencial para la sobrevivencia de los espermatozoides durante su transporte en el tracto genital femenino. Las proteínas suprimen la inmunidad local, proporcionan interacciones con las células epiteliales en determinadas regiones anatómicas y la adherencia de los espermatozoides a la membrana del ovocito en el momento de la fecundación (Amann y Graham, 1993).

4.4 ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DEL ESPERMATOZOIDE

La célula espermática se divide en cabeza, cuello, pieza intermedia y cola. En la cabeza está localizado el núcleo, compuesto de cromatina altamente condensada que contiene el material genético. Los 2/3 anteriores de la cabeza están cubiertos por el acrosoma, que posee las porciones apical, principal y ecuatorial (Morel 1999).

El acrosoma contiene glicopéptidos y enzimas hidrolíticas, como hialuronidasa, proacrosina/acrosina y lipasas que son liberadas en el momento de la reacción acrosómica. El cuello conecta a la pieza intermedia con la cabeza. En el centro de la pieza intermedia está localizado el axonema, rico en ATPasa, que transforma la energía química en acción mecánica. Circundando longitudinalmente el axonema están las fibras densas que dan estabilidad a la estructura. Envolviendo las fibras densas, se disponen las mitocondrias en forma helicoidal y alta concentración. Son las responsables de la alta producción de ATP. La cola está compuesta de una pieza principal y otra Terminal. La pieza principal es una continuación de la pieza intermedia donde las fibras densas y el axonema presentan el menor diámetro. Las mitocondrias ausentes en la cola son sustituidas por una vaina fibrosa (Amann y Graham 1993; Morel, 1999).

La membrana plasmática envuelve todo el espermatozoide y está fija en puntos específicos. Permanece intacta, con excepción del acrosoma, durante la reacción acrosómica, como el resultado de la senilidad o la muerte celular. La membrana plasmática está formada por una doble capa de lípidos, una interfase de fosfolípidos y agua y un glicocaliz. Los principales lípidos encontrados en la membrana son fosfolípidos y colesterol. La proporción de

ambos determina la fluidez de la membrana. Cuanto mayor es la cantidad de fosfolípidos, mas fluida es la membrana. El colesterol, juntamente con las proteínas estabiliza la membrana. (Amann y Graham, 1993).

El 50% del peso de la membrana está compuesto de otras proteínas. Las proteínas estructurales pueden actuar como canales o poros para permitir el pasaje de pequeñas moléculas (Morel 1999).

Bajo ciertas circunstancias, como el enfriamiento o la congelación, ocurre una transición de fase en la cual una porción líquida de la membrana plasmática se transforma en gel, pudiendo causar alteraciones estructurales irreversibles o disturbios metabólicos y muerte celular. En espermatozoides equinos, la temperatura en que este cambio de fases ocurre de forma más intensa es a 20.7°C, más baja de la que genera el mismo fenómeno en las especies porcina y bovina. Esto puede reflejar una variación en la tolerancia a caídas bruscas de la temperatura (Amann y Graham, 1993; Morel, 1999).

4.5) METABOLISMO DEL ESPERMATOZOIDE

La principal fuente de energía disponible para los espermatozoides eyaculados son los carbohidratos de sustrato extracelular. Los espermatozoides equinos metabolizan rápidamente los monosacáridos como la glucosa, pero tienen capacidad muy limitada para utilizar otros azúcares o carbohidratos más complejos. La glucosa se liga a proteínas de transporte para atravesar la membrana plasmática (Morel, 1999).

La necesidad energética es suplida en 90% por los sustratos exógenos y el restante en las células espermáticas. La producción endógena de ATP es relativamente constante. A partir de los sustratos exógenos, ella depende del medio y la temperatura (Mann, 1964).

Los espermatozoides equinos dependen principalmente del metabolismo aeróbico para la producción de ATP (Mann, 1964). Este metabolismo produce cantidades significativas de peróxido de hidrógeno en las mitocondrias, que tiene un efecto adverso sobre las membranas por causar la peroxidación de los

lípidos, comprometiendo la integridad estructural, la motilidad y la viabilidad espermática. Sustancias antioxidantes presentes en el plasma seminal reducen este efecto (Álvarez y Storey, 1984).

Para que el semen sea apto para la fecundación aun es necesario que tengan lugar alteraciones bioquímicas en el espermatozoide como la reacción del acrosoma y la hiperactivación, inherentes al proceso de capacitación, como ocurre en el bovino. La capacitación es inducida a través del contacto de las células con las secreciones presentes en el tracto genital y tienen una duración de 6h (Baraska y Tischner, 1995).

El fluido del oviducto es bioquímicamente complejo y contiene numerosos componentes que influyen sobre las señales celulares, la función de los gametos y el desarrollo embrionario. Las glicoproteínas específicas del oviducto presentan, *in vitro*, positivos efectos sobre la capacitación espermática, unión de los gametos, penetración del ovocito y desarrollo embrionario (Killian, 2004). El bicarbonato tiene una función clave en provocar la capacitación y reacción acrosómica (Colenbrander y col., 2002, Rathi y col., 2003).

Las respuestas a la señal de bicarbonato difieren en las diferentes regiones del espermatozoide. En la región apical de la cabeza se induce la reorganización fosfolipídica, en la cola la fosforilación de la tirosina y la hipermotilidad. Inicialmente el bicarbonato conduce a la activación de la proteína quinasa A, la cual genera cambios en las cargas de la membrana y la distribución de los lípidos y proteínas de la membrana, provocando la reorganización dinámica de los microdominios, incremento de la fluidez de la membrana y eliminación del colesterol. Son activadas señales adicionales complementarias que completan la capacitación (Mann, 1984).

La progesterona es un inductor fisiológico de la reacción acrosómica (RA) a través de una vía independiente de la presencia de bicarbonato (Rathi y col., 2002; Ball y col., 2004). La activación de los receptores de progesterona (RP) está asociada con el proceso de capacitación y es requerida para inducir la reacción acrosómica. La progesterona y el bicarbonato juntos indujeron la RA

en una proporción significativamente superior que el bicarbonato solo. Ello confirmaría la hipótesis que ambos tienen vías de inducción diferentes y aditivas. La RA, vía bicarbonato es bloqueada por medio de inhibidores de la PKA, sin embargo la vía de la progesterona no (Wu y col., 2006).

La producción de bajos niveles de radicales libres de oxígeno (peróxido y superóxido) inducen a la capacitación de los espermatozoides, caracterizada por un aumento de la fosforilación de la tirosina y de la exocitosis de las enzimas acrosómicas en respuesta al aumento de los agonistas de la progesterona. Esto sugiere un papel fisiológico para la producción de bajas concentraciones de radicales libres de los espermatozoides equinos (Baumber y col., 2003), los cuales serían importantes durante la capacitación (Ball y col., 2004).

Debido a estas modificaciones de la membrana el espermatozoide capacitado está preparado para sufrir la reacción acrosómica inducida por agonistas, en algunos casos comunes a la capacitación (bicarbonato y P4). La alteración de los lípidos y de la concentración de proteínas primarias de unión a la zona pelúcida, como las proteínas SNARE de la membrana de la región apical de la cabeza espermática son probablemente responsables de estas alteraciones (Gadella y Colenbrander, 2004). Los sementales con problemas de fertilidad presentan, además de una calidad inferior espermática, acrosómica, una inferior cantidad de células espermáticas coloreadas positivamente para SNARES, que el semen de sementales fértiles (Gamboa y Ramalho-Santos, 2005).

El tratamiento con 1,2mM dibutiril AMPc y 1mM de cafeína aumenta la fosforilación de la tirosina de las proteínas asociadas a la cola del espermatozoide. Este aumento es amplificado, a través de la adición de methyl β -cyclodextrina, que promueve la salida del colesterol y se considera que está involucrado en la capacitación espermática. El aumento de la fosforilación por medio de activadores es inhibida por medio de la adición de la proteinkinasa A (Pommer y Meyers, 2002).

V EXAMEN REPRODUCTIVO DEL SEMENTAL

El objetivo de realizar un examen de la salud reproductiva del garañón es determinar si tiene la capacidad, tanto física como de comportamiento, que aseguren un buen desempeño reproductivo. (Galina, 2008). Estas facultades incluyen la producción de semen con un adecuado número de espermatozoides viables, que el macho este libre de enfermedades infecciosas transmisibles por vía genital, que tenga una conducta sexual normal, y que tenga la capacidad física para realizar una monta. Será necesario realizar un examen de salud reproductivo en garañones que se desee seleccionar como sementales, antes de operaciones de compra venta de machos, y en caballos con buenas actuaciones en pruebas de pista, carreras, o lo que se desee (Zarco, 2000).

El mismo autor propone que el examen reproductivo del semental se divida en: historia clínica, examen físico general, examen andrológico, evaluación de la conducta sexual (libido y capacidad para la monta) y evaluación del semen. Se debe contar con un registro, el cual debe incluir identificación del animal, color de pelaje, señas particulares, tatuajes y edad del animal. En algunos casos es aconsejable que se incluyan fotografías del garañón para evitar errores y complicaciones legales posteriores.

5.1 NUTRICIÓN

El semental debe tener una buena condición corporal. La mayoría de los sementales consumen de 2 a 2.5% de su peso corporal en la comida al día, de la cual más de la mitad debe ser de forraje. Durante la temporada de servicios el semental debe ser mantenido con una dieta que contenga 14% de proteína; fuera de la temporada la dieta debe contener 12% de proteína (Galina, 2008).

5.2 UBICACIÓN

Es muy importante que el semental no esté aislado del movimiento general del rancho o cuadra. Aquellos sementales que se aburran están propensos a convertirse en graves problemas de manejo. Sus caballerizas deben estar amplias, bien ventiladas y tener acceso a un potrero o corral donde el caballo pueda distraerse (Galina, 2008).

5.3 EJERCICIO

El ejercicio mantiene al semental en buenas condiciones además de que evita el aburrimiento. La mayoría de los sementales deben realizar suficiente ejercicio si se les suelta en sus corrales durante el día, aunque hay lugares donde se les ejercita de mano o incluso se les monta (Galina, 2008).

5.4 CONDUCTA SEXUAL

La conducta sexual del garañón se puede dividir en: cortejo y apareamiento. El cortejo son todos aquellos patrones de conducta por medio de los cuales el macho y la hembra se hacen saber que fisiológicamente están listos para la cópula. Durante el cortejo los sementales detectan mediante los órganos de los sentidos las señales visuales, auditivas y olfatorias enviadas por la hembra. El semental se aproxima a la yegua con paso encabritado y cuando está próximo a la yegua comienza su exploración olfatoria de frente a la yegua, así como de la región genital y de la orina. Después del contacto nasal el semental manifiesta el característico signo de flehmen, que consiste en elevar la cabeza, replegando los labios de tal manera que muestre los dientes (Palma 2008).

El apareamiento o cópula implica la erección, la monta, la introducción del pene a la vagina, los movimientos pélvicos por parte del macho, la postura de la hembra y la eyaculación del garañón. La eyaculación es un proceso secuencial que envuelve tres eventos: erección, emisión y eyaculación. La erección es el alargamiento y endurecimiento del pene, como resultado del llenado del cuerpo cavernoso con sangre, así como también el cuerpo esponjoso (Morel 1999).

La emisión es el movimiento y depósito de espermatozoides y fluido que proviene desde el conducto deferente y la cola del epidídimo, así como el fluido de las glándulas accesorias dentro de la uretra pélvica. La eyaculación es la expulsión del semen a través de la uretra. Estos estímulos provocan una serie de fuertes contracciones pulsátiles de los músculos uretrales y bulboesponjosos que provocan la salida violenta del semen durante la eyaculación. Durante este proceso la próstata secreta fluido acuoso dentro de

la uretra pélvica y parte de este fluido prostático constituye la fracción preespermática. La siguiente fracción ya incluye la fracción espermática, rica en espermatozoides y secreciones del epidídimo y probablemente fluidos prostáticos y bulbouretrales. Normalmente hay de 3 a 6 descargas secuenciales de fluido rico en espermatozoides. Aunque no siempre está presente el gel o fracción postespermática, esta se deriva de las vesículas seminales. La función del gel no es conocida, pero no está relacionada con la fertilidad. Durante la eyaculación, el garañón mueve la cola hacia arriba y hacia abajo rítmicamente, movimiento conocido como bandereo (Galina, 2008).

5.5 MONTA NATURAL

Puede ser en libertad o dirigida. Existe riesgo de contagio de enfermedades de transmisión sexual. Por lo que es necesario realizar exámenes previos que aseguren la salud, tanto de la hembra como del macho. También hay riesgos de accidentes por golpes o traumatismos por lo que hay que tomar medidas precautorias como el uso gamarras tanto para la hembra como para el macho y de tira pie para la hembra. Si se realiza en libertad se debe asegurar que solo halla un semental con acceso a la(s) hembra(s) en celo.

Para una adecuada aplicación de esta práctica, es de suma importancia asegurarse que la yegua se encuentre en celo. Los signos propios del calor son: Posición de micción, cola levantada, orina frecuente, guiño vulvar, relajación del cerviz, contracciones de la musculatura lisa uterina. El celo ocurre cada 21 días, aproximadamente. El estro tiene una duración aproximada de 8 días, y el diestro de 13-14 días. La ovulación se presenta 48 horas antes de terminar el estro y los espermatozoides duran de 24 a 48 horas con capacidad fecundante en el tracto reproductivo. Tomando en cuenta todo lo anterior se recomienda dar servicio a la yegua cada 48 horas durante los primeros 6 días y cada 24 horas durante los últimos 2 días de celo (Galina 2008).

Durante la cópula, el pene se pone en contacto con el orificio externo del cérvix, y debido a la gran presión del eyaculado el semen es depositado intrauterino. En promedio el volumen del eyaculado es de 50-75 ml con una concentración espermática de 300 a 800 x 10⁶ (Palma 2008).

5.6 EXAMEN DE LA SALUD REPRODUCTIVA

El examen reproductivo del semental consta de: historia clínica, examen físico general, examen de los órganos genitales, evaluación de la conducta sexual (líbido y capacidad para la monta), y evaluación de semen. Para diagnosticar condiciones reproductivas anormales en el garañón es indispensable tener conocimiento de la anatomía de sus órganos genitales. Este conocimiento también es útil para realizar la evaluación de la capacidad reproductiva del semental, así como para el desarrollo de procedimientos de manejo artificial de la reproducción, tales como la recolección de semen y la inseminación artificial (Amann y Graham, 1993).

La evaluación de la salud general del animal está también orientada a determinar la libido, habilidad del semental para la monta y la capacidad reproductiva.

Se examina la condición física general del animal, incluyendo aspecto, pelaje, estado de carnes, y otras características que indican el estado general de salud, tales como la coloración de las mucosas. También se debe realizar la auscultación cardíaca y pulmonar y se deben buscar defectos de conformación tales como hipoplasia testicular, criptorquidismo, hernias inguinales, umbilicales, prognatismo superior e inferior y problemas de aplomos, alteraciones que pudieran ser heredables (Zarco 2000)

A continuación se examinará la conformación general del semental, poniendo atención especial en la columna vertebral, aplomos y miembros anteriores y posteriores, ya que estas partes anatómicas intervienen directamente en el momento de la cópula. Posteriormente debe realizarse un examen oftalmológico, para lo cual se examinan las estructuras del ojo con un oftalmoscopio, lo que permitirá excluir la posibilidad de ceguera, ya que esta condición dificulta el acto de la monta. Por último se recomienda realizar un examen del olfato, el cual resulta complicado, no obstante que el signo de Flehmen es un indicador bastante confiable de la integridad y funcionamiento de este órgano (Galina, 2008).

5.7 EXAMEN DE LOS ÓRGANOS GENITALES

Este examen consta de la revisión de los genitales externos e internos. Los testículos y el epidídimo son palpados a través de la pared escrotal para determinar el tamaño, forma, simetría y consistencia. Los testículos se examinan inicialmente uno por uno para determinar sus medidas. Los testículos normales miden de 8 a 12 cm. de largo, 5 a 7 cm. de altura y 4.5 a 6 cm. de ancho. Posteriormente se palpan los dos testículos juntos para determinar el ancho escrotal, que normalmente varía de 9 a 13 cm (Palma 2008)

La evaluación del ancho escrotal de debe realizar cuando el pene no esté erecto, ya que la erección ocasiona que los testículos se separen uno del otro. Ambos testículos deben tener aproximadamente la misma forma, consistencia y tamaño, aunque algunas veces el testículo derecho es ligeramente más grande que el izquierdo. El epidídimo se palpa para determinar su tamaño, forma, consistencia y localización. La cabeza del epidídimo se encuentra en posición anterior y superior con respecto a los testículos. El cuerpo del epidídimo corre dorsolateralmente a lo largo del testículo, siendo una estructura estrecha que mide de 5 a 10 mm de diámetro. La cola del epidídimo se encuentra localizada caudalmente con respecto al testículo, y es prominente, por lo cual es fácil de palpar en casi todos los machos; mide de 2 a 2.5 cm. de diámetro y tiene una consistencia ligeramente suave y uniforme con respecto al epidídimo (Galina 2008).

El cordón espermático se palpará craneal a la entrada de la pelvis, a cada lado de la línea media: mide de 2.5 a 3 cm. de diámetro y es de una consistencia suave y uniforme. El conducto deferente es una estructura tubular que no puede delinearse debido a que se encuentra rodeado por el músculo cremáster y la vena espermática (Zarco 2000).

El escroto es una estructura que se evalúa mientras se palpan los testículos. La piel del escroto debe ser delgada y flexible, al tacto se encuentra lubricada debido a la presencia de glándulas sebáceas y sudoríparas.

Para evaluar el pene y el prepucio es necesario estimular al semental para provocar que el garañón se excite y el pene tenga erección. El pene se examina cuidadosamente, poniendo atención especial en el proceso uretral y el divertículo, donde se puede encontrar acumulación de smegma, el cual es de consistencia densa y color café negruzco, aunque algunas veces se observa de color violenta cuando pigmenta la piel del prepucio. El pene y el pliegue interno y externo del prepucio se examinan mientras permanece la erección (Galina 2008)

Las glándulas sexuales accesorias del garañón están localizadas internamente, por lo que se evalúan por vía rectal. La preparación y contención del semental será igual que la que se realiza para palpación rectal de la hembra (Boyle 1992).

Las ámpulas se localizan cerca de la línea media del piso de la pelvis, y son un ensanchamiento de la parte distal del conducto deferente. Las ámpulas descansan sobre el borde anterior pélvico y sobre uno de los extremos de la vejiga urinaria, dando una apariencia de Y. Miden aproximadamente de 12 a 20 cm. de diámetro. Las vesículas seminales son glándulas pares con una delgada pared elongada y de forma ligeramente piriforme (Galina 2008).

Miden aproximadamente de 8 a 10 cm. de longitud y de 3 a 5 cm. de diámetro, tienen una consistencia flácida. La palpación de las vesículas se debe realizar antes que la recolección de semen, para que se encuentren plétóricas de secreciones gelatinosas que hacen que se distiendan y sea fácil su localización. La próstata y las glándulas bulbouretrales no pueden ser palpadas rectalmente debido a que la primera se encuentra cubierta por tejido retroperitoneal, mientras que las glándulas bulbouretrales se encuentran profundamente enclavadas bajo los músculos bulbouretrales. (Galina, 2008)

VI MÉTODOS DE RECOLECCIÓN DE SEMEN

Para tener éxito en un programa de inseminación artificial en equinos es imprescindible conocer los métodos de recolección de semen de los garañones, así como los métodos de evaluación y preservación. Otro uso de estos métodos es evaluar el potencial reproductivo de un semental que se quiera dedicar para cría. (Zarco, 2000).

Para realizar la recolección de semen se requiere contar con una hembra en estro, o bien, si el garañón está entrenado se puede utilizar un maniquí de monta, potro de montas o Domy (Palma 2008)

Si se utiliza una yegua ésta deberá estar en estro, a la yegua se le venda la cola para evitar laceraciones. Además a la yegua se le debe poner un tirapié para evitar que patee al garañón o al operador al momento del cortejo o de la recolección del semen. Si se pretende utilizar un maniquí es necesario entrenar al macho durante varias semanas o meses, dependiendo de su líbido, estimulándolo con la presencia de una yegua en estro para acostumbrarlo poco a poco a montar al maniquí. Antes de recolectar el semen se debe lavar el pene del garañón, lo que debe realizarse delante de una yegua en celo para que el macho tenga una erección y pueda procederse al lavado. El pene se asea exclusivamente con agua tibia, posteriormente se debe secar. Para la recolección de semen en el equino se usa generalmente una vagina artificial la cual se basa en un aparato rígido o semirrígido con sus respectivas mangas de látex, el receptáculo del semen y una válvula de presión. (Galina, 2008).

La recolección de semen se lleva a cabo con una vagina artificial (VA). Existen varios modelos, todos tratan de imitar las condiciones de temperatura y presión de la vagina de la yegua, estímulos necesarios para desencadenar la eyaculación (Palma 2008).

6.1 VAGINA ARTIFICIAL (V.A)

Entre los modelos disponibles se encuentran el Hannover, el Missouri, CSU, Nishikawa, Cambridge y el polaco, entre otros. El modelo polaco es una vagina abierta de ambos lados y permite la recolección de semen fraccionada, o sea, la separación de la fracción rica de la fracción pobre de espermatozoides (Palma 2008).

La vagina artificial modelo Hannover está compuesta de un tubo rígido, un tubo flexible o interno de goma, un vaso recolector, 4 bandas de goma, una válvula y la manija de cuero. El tubo flexible y el vaso recolector deben ser esterilizados antes de su uso. Durante el montaje de la vagina se debe tomar la precaución de no tocar las partes de la vagina artificial que toman contacto con el pene o semen (Love 1992).

Para armar la VA el tubo flexible es colocado en el interior del tubo rígido. El tubo flexible es 1/3 más largo que el rígido. Ello permite revertir las partes excedentes sobre el tubo rígido y fijarlas con 2 bandas de goma. Del otro lado del tubo rígido el tubo flexible se estira a fin de evitar la formación de pliegues transversales. Es importante en este momento verificar que el tubo no esté torcido. Los 2/3 restantes del tubo flexible excedente son rebatidos, en parte, sobre sí mismos, para permitir la fijación del recipiente recolector con una banda. El restante es rebatido sobre el extremo posterior del tubo rígido y fijado con 2 bandas elásticas. El espacio comprendido entre la pared interna del tubo rígido y el tubo flexible es llenado, por un orificio en el medio del tubo rígido con 3L de agua a una temperatura de 50 ° a 55 °C, dependiendo de la temperatura ambiente para alcanzar una temperatura interna de 42 ° a 44 °C (Klug, 1993).

La colocación de un mayor volumen de agua permite la conservación de esta temperatura por un periodo mas prolongado. La lubricación de la VA se realiza con vaselina estéril o gel hidrosoluble no espermicida. El lubricante debe ser distribuido en el interior de la vagina con la mano en forma uniforme, usando un guante desechable, colocando un poco mas de lubricante en la parte anterior. Existe una válvula u orificio para el llenado con agua. Concluido

el montaje se introduce un termómetro en el interior de la vagina para controlar la temperatura hasta el momento de la recolección. Para evitar el shock térmico y la exposición a la luz solar, puede ser usado un protector aislante que cubra el recipiente recolector. (Love, 1992).

La limpieza del tubo flexible después de su uso debe ser realizada inicialmente con agua fría y posteriormente caliente. Pueden ser esterilizados pro medio del autoclave (Klug, 1993) o desinfectados a través de inmersión en alcohol etílico o isorpopílico (Love, 1992), a 70% durante 20 min. Posteriormente deben ser colgados para secarlos en un local protegido del polvo. En caso que sea necesario emplearlos inmediatamente después de la inmersión deben ser enjuagados con abundante agua caliente y posteriormente con solución salina o secado. Este proceso acorta la vida útil del tubo flexible (Kenney *et al* 1975)

La utilización de un tubo interno desechable de polietileno estéril es una modificación del montaje de la VA modelo Hannover, que facilita la limpieza del tubo flexible de goma y torna innecesaria su esterilización. El tubo desechable se fija al tubo rígido, recubriendo el tubo de goma, y sostiene le vaso recolector. Algunos sementales no aceptan el tubo de polietileno, en este caso se debe recurrir al tubo original (Klug, 1993).

6.1.1 INSTALACIONES PARA LA RECOLECCIÓN CON V.A.

La recolección de semen puede ser realizada tanto en un área cubierta como al aire libre. El piso del local debe ser firme y no resbaladizo, aún cuando esté mojado. Otro aspecto importante es que no debe favorecer la formación de polvo. Cuando las recolecciones son repetidas con frecuencia en el mismo lugar, es aconsejable que haya un buen drenaje para facilitar la limpieza y desinfección (Kenney *et al* 1975).

6.1.2 YEGUA EN CELO PARA LA RECOLECCIÓN CON V.A.

Para recolectar el semen es necesaria la presencia de una yegua en celo. Los signos externos cuando una hembra presente celo se manifiestan levantado y desviando la cola hacia un lado, contracciones frecuentes de los labios de la vulva, exteriorización del clítoris y emisión de orina. Como súcubo pueden ser utilizadas yeguas en celo. Si no se dispone de una puede inducirse por medio de la aplicación de prostaglandina o sus análogos o también progestágenos. Otra alternativa es el empleo de hembras con quistes ováricos o tumores de la granulosa, por que presentan celo permanente o el empleo de hembras ovariectomizadas con o sin tratamiento estrogénico, en pequeñas dosis 0.12 – 0.25 mg (cipionato de estradiol) a intervalos superiores a 4 días (Love, 1992).

Para la recolección de semen, las yeguas deben ser preparadas. El periné y la región adyacente a la vulva deben ser higienizados y la cola envuelta y fijada. Como el semental en el momento de realizar la monta tiende a morder el cuello, está indicado el uso de protectores de la piel. La contención se lleva a cabo con la ayuda de una mordaza. En caso de no contar con personal que desvíe la cola, ésta debe ser atada a la extremidad y tirada hacia delante entre los miembros posteriores (Hilman *et al* 1980).

6.1.3 MANIQUÍ PARA LA RECOLECCIÓN CON V.A.

Los sementales pueden ser entrenados para el salto sobre un maniquí, el cual minimiza el riesgo de accidentes. Los maniqués varían en la forma desde réplicas groseras de una yegua, hasta barriles suspendidos sobre postes. El maniquí debe ser firme, bien acolchado y revestido de material poco abrasivo e impermeable para facilitar la limpieza. Cuando la recolección es realizada sobre un maniquí, una hembra en celo es mantenida en la proximidad, en general por delante del maniquí para estimular al macho. En animales entrenados, la presencia de la yegua en celo muchas veces no es indispensable (Love, 1992).



Fig. 2: Maniquí o potro de montas para extracción del semen con vagina artificial

5.1.4 RECOLECCION DEL SEMEN CON V.A.

Una vez que el equipamiento para la evaluación y manipulación del semen (baño María, platina térmica, etc.), la yegua en celo o el maniquí preparados, la vagina artificial montada y con la temperatura adecuada de 42°-44°C y el termómetro fuera de la VA el semental puede ser conducido a la sala de recolección. La monta del macho responde a una cadena de reflejos copulatorios. Por ese motivo la recolección debe imitar la monta natural el macho se acerca a la hembra o maniquí con el con el cuello arqueado, la cola levantada y la orejas hacia delante (Love, 1992).

Cuando la recolección de semen se lleva a cabo con la vagina modelo Hannover, la persona que la realiza debe colocarse del lado derecho de la yegua a una distancia de 1,5m del tren posterior, sosteniendo la VG sobre el brazo derecho. Con otros modelos, es posible realizar la recolección del lado izquierdo. El salto del macho solo será permitido después de la completa erección del pene. De acuerdo con el tamaño del pene, la válvula de la VA es removida, parte del agua será retirada y la válvula colocada nuevamente y mantenida abierta. Cuando el semental salta con los miembros anteriores por encima de los posteriores de la yegua, el operador con la VA se aproxima, tomando el pene y desviándolo con la mano izquierda enguantada (Kenney *et al*, 1975).

Para la desviación es importante dirigir la mano izquierda sobre el pene y desviarlo ligeramente, sin fijarlo, porque puede interrumpir los reflejos de la

cópula. Después del desvío del pene, la VA, apoyada en el cuarto de la yegua se ofrece al macho. El macho introduce el pene en la vagina artificial y realiza 7-8 movimientos de fricción, durante los cuales la vagina debe ser mantenida firme en la misma posición, simulando el comportamiento de la yegua (Hilman *et al* 1980).

La mano izquierda que realiza el desvío es colocada ahora sobre la entrada de la vagina y la base del pene, posición que permite reconocer la eyaculación, que ocurre después de los movimientos de fricción por las contracciones de la uretra. Durante la eyaculación también se observan movimientos de la cola del semental en forma ondulatoria. Confirmando el inicio de la descarga se semen la VA debe ser inclinada hacia abajo. Para este fin el operador asegura la manija de la VA con la mano izquierda primero, para poder retirar la mano derecha que la sostiene, retirar la válvula y volver a fijarla con la mano derecha, después de inclinada. Esta inclinación de la vagina artificial es necesaria para que el semen descienda inmediatamente al interior del recipiente recolector (Love, 1992).

Algunos sementales requieren el uso de VA a una temperatura más elevada. En estos casos se puede elevar la temperatura hasta 46° a 48 °C. sin embargo debe tenerse en cuenta que las temperaturas superiores a 45 °C son perjudiciales para los espermatozoides (Hilman *et al* 1980).

Después de la eyaculación desaparece la erección y el operador, manteniendo la vagina inclinada, la retira lentamente, acompañando el descenso del macho. En este momento el operario que sostiene al semental deberá girar la cabeza hacia la derecha, porque algunos machos tienen la costumbre de girar y patear. Después del descenso del pene debe ser higienizado con agua tibia. Inmediatamente después de la recolección, la VA es llevada al laboratorio, donde se seca el exterior para evitar que caiga agua en el interior del vaso recolector, en el momento de retirarlo (Love, 1992).

La recolección de semen con VA es sin duda el método más eficaz para la obtención de un eyaculado. Cuando, debido a lesiones músculo-esqueléticas o neurológicas, el semental no logra hacer el salto o alcanzar la erección se

puede intentar la recolección con VA en estación o utilizando métodos alternativos (Love, 1992).

6.2 ESTIMULACION MANUAL

Una yegua en celo es mantenida en la proximidad, para que el macho se estimule. La base del pene erecto deberá ser cubierta con bolsa plástica. La eyaculación podrá ser provocada por medio de la aplicación de compresas calientes, toallas sumergidas en agua a 45° - 50°C sobre el glande y la base del pene, estimulando siempre la extremidad del glande con presión intermitente con el dedo medio (Love, 1992).

6.3 INDUCCION FARMACOLÓGICA CON XILACINA.

La eyaculación puede ser inducida con agentes alfa-adrenérgicos. La aplicación de 0.6mg/Kg. IV de clorhidrato de Xilacina, después de la estimulación sexual durante 10-15 min., resultó en la eyaculación de 39% de los animales dentro de los 2 min. después de la administración de Xilacina en la mayoría de los animales (McDonnel y Love, 1991). El eyaculado es recolectado en una bolsa plástica no espermicida, colocado sobre el prepucio y fijado por medio de una blanda elástica (Turner *et al* 1995).

Los eyaculados obtenidos por medio de la inducción con Xilacina presentan características semejantes a los obtenidos con la VA (McDonnel y Love, 1991). Aquellos obtenidos por medio de inducción con imipramide presentan la concentración elevada y bajo volumen. La motilidad después de la descongelación, la longevidad y tasa de alteraciones morfológicas son semejantes a la del semen recolectado por medio de la VA (McDonnel y Love, 1991).

VII EVALUACION DEL SEMEN

La evaluación de semen se realiza como parte del examen andrológico para verificar la *potencia generando* para la compra y venta de reproductores, antes del inicio de la temporada de monta e inseminación artificial. El análisis

clásico comprende la evaluación de la concentración, número total de espermatozoides en el eyaculado, motilidad y morfología. Los valores fisiológicos se muestran en la tabla 1. El análisis aislado de los valores espermáticos no presenta alta correlación con la fertilidad del semental. Sin embargo el porcentaje de espermatozoides viables, móviles y la penetración de ovocitos de hámster sin zona pelúcida presentan alta correlación con la fertilidad del macho (Wilhelm *et al* 1996).

Tabla 1 Medidas de valores seminales equinos de acuerdo a diferentes autores

Valores seminales	Autor/es			
	<i>Pickett y col. (1975)</i>	<i>Dowset y Pattie (1982)</i>	<i>Klug (1982)</i>	<i>Mattos y col. (1989)</i>
Volumen total (ml)	66	63.6	-	-
Volumen sin gel (ml)	52	45.3	75.6	60.0
Volumen de gel (ml)	7	16.8	-	-
Concentración (10^6 /ml)	281	178.0	304.5	250.0
Nr total de espermatozoides	15	7.2	21.6	12.0
Motilidad total (%)	73	72.1	63.1	15.0
Movimiento progresivo (%)	-	-	35.6	25.0
Espermatozoides vivos (%)	-	-	69.5	75.0
<i>Espermatozoides sin alteraciones morfológicas (%)</i>	-	-	55.6	50.0

El volumen total del eyaculado es de 60 a 70 ml con un rango de 30 a 300 ml. Su color es blanco pálido con apariencia de leche descremada. El pH del semen equino es ligeramente básico con un rango de 7.2 a 7.7; se determina usando un potenciómetro preferentemente en la primera hora después de la recolección del semen. El espermatozoide equino es muy delicado, por lo cual el recipiente colector no se debe exponer a la luz directa ni a cambios bruscos de temperatura. Para ello se debe mantener dentro de una incubadora a baño maría a una temperatura de 38°C. (Wilhelm *et al* 1996).

La primera variable microscópica a evaluar es la motilidad progresiva. Esta variable es muy importante, ya que existe una alta correlación entre el

porcentaje de motilidad progresiva y la fertilidad. El porcentaje normal de motilidad progresiva es de 75%, con un rango de 60 a 95%. La concentración espermática del garañón es de 150 a 300 millones por ml. Existen aparatos especializados para la medición de la concentración espermática, como el Spermacue. Se utiliza una muestra de semen no diluida y cuenta con calibración automática, dando inmediatamente el resultado en millones de espermatozoides /ml y opera con baterías (Galina 2008)

Existe un densímetro equino que estima rápidamente la concentración espermática de números de espermatozoides por ml de semen libre de gel y ejecuta todos los cálculos requeridos para procesar el semen de uso inmediato o refrigerado. Este densímetro cuenta con un software para conservar toda la información de eyaculados de los garañones en una computadora personal. Este aparato cuenta con un sistema experto que puede ser calibrado para permitir medir la concentración espermática de otros animales domésticos. (Galina, 2008)

7.1 EXAMEN MACROSCÓPICO

Después de retirado el recipiente recolector de la VA, se debe tomar precaución de no someter el semen a cambios bruscos de temperatura. Por eso todo el material que entra en contacto con el semen, como probetas, láminas, pipetas y diluyente, deben estar pre-calentados en una platina térmica a 38°-40°C y baño María a 37°C. El eyaculado debe estar identificado con el nombre del semental, fecha y hora de la recolección y número de eyaculado, cuando fue realizada más de una recolección del mismo animal (Boyle 1992).

La fracción gel, producida por las vesículas seminales, debe ser separada lo más rápido posible, debido al efecto negativo que tiene sobre los espermatozoides. Esto se puede realizar inclinando el recipiente y eliminando el gel mecánicamente con ayuda de una pipeta. El semen restante puede contener aun una pequeña cantidad de gel, el cual debe ser eliminado a través de filtración con una gasa estéril volcando el semen en una probeta graduada. Algunas vaginas artificiales poseen filtros desechables, cuando eso no ocurre es posible adaptarles un filtro. Filtros de nylon con poros de 37 μm son los más

indicados porque retienen un número menor de espermatozoides (Amann *et al* 1983).

7.1.1 VOLUMEN

El volumen del eyaculado es la suma del volumen del semen y el gel. El volumen del semen sin el gel es determinado a través de la lectura de la probeta graduada, después de la filtración. Antes de hacerlo, debe mantenerse la probeta en baño María a 37°C, como fue indicado anteriormente (Palma 2008).

7.1.2 ASPECTO

Después de la separación del gel el aspecto del semen es evaluado, teniendo en cuenta como base su coloración y consistencia. La coloración del semen varía de gris ceniza a blanco y la consistencia puede variar de acuoso a lechoso. El aspecto del semen da una idea de la concentración espermática. Cuanto más blanco lechoso, mayor es su concentración. Además de eso. La apariencia permite establecer la presencia de urospermia y hemospermia. Tanto la orina como la sangre tienen efecto negativo sobre los espermatozoides, porque influyen negativamente sobre la calidad, indicando además alteraciones orgánicas que deben ser diagnosticadas y tratadas. El semen es inodoro. En caso de urospermia, su presencia puede ser detectada por el olor a orina en el semen (Amann *et al* 1983).

7.1.3 pH

El pH del semen equino varía entre 6.2 y 7.8 Puede ser medido por medio de un peachímetro o de manera menos exacta, a través de cintas indicadoras de pH. El pH debe ser determinado inmediatamente después de la recolección por que el reposo genera la formación de ácido láctico. Alteraciones de pH exigen un examen cuidadoso del semental, por que pueden ser indicación de presencia de infección u orina en el semen (Mann, 1964).

7.2 EXAMEN MICROSCOPICO

El examen microscópico se lleva a cabo preferentemente con un microscopio óptico con contraste de fase y una placa térmica a 40°C.

7.2.1 MOTILIDAD

El porcentaje de espermatozoides móviles de la muestra es el valor más comúnmente empleado para evaluar la calidad espermática, a pesar que sola no está altamente correlacionado con la capacidad fecundante del semen (Graham, 2001a). Una estimación visual de la motilidad debe ser realizada en todas las muestras de semen, porque permite, al lo menos, identificar las muestras de semen que, probablemente, presenten baja fertilidad (Graham, 2001b).

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, con máximo, 5 minutos después de la recolección. La motilidad será evaluada tanto en el semen *in natura* como en el diluido. Para el estudio de la motilidad en este momento se pueden usar soluciones diluyentes como aquellas utilizadas para el enfriamiento del semen: preferentemente aquellas con yema de huevo porque ésta toma la solución óptimamente opaca (Palma 2008).

La motilidad espermática puede ser estimada mediante el método visual, subjetivo, o utilizando sistemas computarizados. Para la determinación visual 3 pequeñas gotas de semen previamente homogenizado son colocadas separadamente sobre el portaobjetos limpio y pre-calentado y cubiertas con láminas cubreobjetos (18 x 18 mm). La motilidad es determinada con un aumento de 200 x en varios campos de cada gota. Inicialmente es estimado el porcentaje de espermatozoides móviles e inmóviles. Posteriormente se determinan los espermatozoides con motilidad rectilínea progresiva y local. El resultado es dado en porcentaje (Graham, 2001b).

7.2.2 CONCENTRACIÓN

La concentración se establece a través del número de espermatozoides por unidad de volumen. Puede ser medida a través del recuento en cámaras (Nuebauer) o un espectrofotómetro. Para el recuento en la cámara de Nuebauer puede ser utilizada una dilución de 1:20 o 1:40 en una solución fijadora de formol-salina o Harem (Tabla 2). Para la dilución de 1:20 una alícuota de 0.5 ml de semen es diluida en 9.5 ml de solución fijadora. La

cámara se monta deslizando la lámina con presión sobre los bordes humedecidos hasta que se forman los anillos de Newton. La cámara posee 2 hemicámaras, conteniendo cada una de ellas 16 cuadros menores. 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 5 min., necesarios para la sedimentación de las células espermáticas, éstas son contadas. El número de espermatozoides es dividido por el área contada ($10/25 \text{ mm}^2$), multiplicada por la altura de la cámara ($1/10 \text{ mm}$) y por la dilución utilizada ($1/20$).

$$C = \frac{\text{N}^\circ \text{ total de espermatozoides contados}}{\text{h.d.a}} \quad \begin{array}{l} \text{h (altura) = } 1/10 \\ \text{donde: d (dilución)= } 1/20 \\ \text{a (altura) = } 1/25 \text{ mm}^2 \end{array}$$

Simplificando el número de espermatozoides contados en 10 cuadrados grandes y multiplicado por el factor 500, cuando la dilución es 1:20 fue usada, o por 100 cuando la dilución es 1:40, se obtiene el resultado en millones de espermatozoides/ml (Palma 2008)

Tabla 2. Composición de las soluciones de formol citrato y de Hayem

Formol Salina		Hayem	
Na ₂ HPO ₄	4,93g	NaSO ₄	24,20g
KH ₂ PO ₄	2,54g	ClO ₃ Na	4,80g
Formolaldehido 38%	125,50g	(ClO ₃) ₂ Hg	2,42g
NaCl	5,41g	Agua destilada	968,5ml
<i>Agua destilada</i>	c.s.p 1000ml		

7.2.3 NÚMERO TOTAL DE ESPERMATOZOIDEOS

El número total de espermatozoides se obtiene multiplicando la concentración por el volumen de semen, ajustándose la unidad de medida a cm^3 o mm^3 .

7.2.4 COLORACION SUPRAVITAL

La coloración supravital realizada con eosina amarillada 2% determina de forma más objetiva las células viables para determinar la integridad de la membrana plasmática. Cuando las células sufren una lesión de la membrana, absorben el colorante. La coloración se lleva a cabo depositando en una extremidad del portaobjetos entibiado 1 gota de semen y 2 de colorante. Con ayuda de un cubreobjetos la gota de semen es mezclada con las gotas de colorante y se hace el extendido, el cual será secado durante 30 seg. sobre la platina térmica. La lámina puede ser almacenada en un lugar seco. Los espermatozoides coloreados y sin colorear se cuentan con un aumento de 400x hasta un total de 200 células. El resultado es expresado en porcentaje. Los espermatozoides no coloreados representan a las células viables y los coloreados a las células muertas (Krause, 1966).

7.2.5 MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA

Este examen determina el porcentaje de espermatozoides con y sin alteraciones morfológicas. Se realiza antes del inicio de la temporada de monta y después, esporádicamente como control. Existen diversas clasificaciones para las alteraciones morfológicas, sin embargo la suma de las alteraciones de acrosoma y cabeza no deben pasar 5% y 10% respectivamente y el número total de las alteraciones no debe ser superior a 30%. Hay, sin embargo, una cierta flexibilidad de los porcentajes (Brinsko *et al* 2003a).

La morfología puede ser analizada diluyendo una alícuota de semen en solución fijadora y examinando la muestra entre porta y cubreobjetos en el microscopio con contraste de fase con un aumento de 1000x. Esta técnica sin embargo, no permite una buena evaluación del acrosoma con una lente de inmersión. (Garner *et al* 1986)

Existen diferentes coloraciones para acrosoma. El método de Cerovsky es de rápida ejecución y posibilita una rápida evaluación del acrosoma Para esta coloración se hace un extendido del semen sobre un portaobjetos precalentado. El extendido es secado y sumergido en una solución saturada de rojo Congo diluido en agua durante 20 seg. La lámina es lavada por su reverso con agua corriente y sumergida en una solución de violeta de genciana 0.5%, 5

seg. El portaobjetos es lavado nuevamente y secado al aire. El examen de la morfología se realiza con una lente de inmersión (1000x), contándose 400 espermatozoides. El resultado se expresa en porcentaje (Mattos et al 1990).

7.2.6 TEST O PRUEBAS FUNCIONALES

Coloración fluorescente

Las combinaciones desarrolladas fueron la de diacetato de carboxifluoresceína/ioduro de propídio (Garner *et al* 1986) y de calceína AM/homodímero de etidio. La carboxifluoresceína y la calceína AM son permeables y desterificadas en el interior de las células espermáticas. La carboxifluoresceína o la calceína libres resultantes son fluorescentes, coloreando de verde el citoplasma de las células intactas. Por otro lado, el ioduro de propídio y el homodímero de etidio solo se unen y colorean el ADN celular de rojo, en células con membrana lesionada. Para el estudio es necesario un microscopio de fluorescencia o realizar citometría de flujo (Althouse y Hopkins, 1995).

La integridad de la membrana presenta una alta correlación con la motilidad total (Malmgren, 1997) y el movimiento progresivo en el semen fresco y enfriado (Brinsko *et al* 2003a). Un nuevo procedimiento, presentado recientemente, fue una opción de coloración de fluorescencia llamada VIADENT, usada para determinar rápidamente la viabilidad y motilidad de una muestra de semen refrigerado equino. El colorante es Hoechst 33258, que solo colorea las células con membranas dañadas, bajo la luz ultravioleta los espermatozoides viables no fluorescerán. La opción VIADENT debe emplear luz visible, a través de un diodo emisor de luz azul, que permitirá determinar la concentración y motilidad, antes de emplear la luz fluorescente para establecer el número de células no viables (Wessel y Althouse, 2006).

Hipo-ósmosis

Una propiedad de la membrana plasmática es su habilidad de permitir el transporte selectivo de las moléculas. En condiciones hipo-osmóticas se establece un flujo de agua al interior de la célula, a fin de mantener el equilibrio osmótico. Ello provoca un aumento del volumen del espermatozoide

especialmente de la cola, donde se observa un enrollamiento de la cola, que indica que la membrana está intacta (Jeyedran *et al* 1984).

El test hipo-osmótico es un análisis simple, altamente preciso y consistente, que presenta buena confiabilidad y repetibilidad. Después de la recolección de 100µl de semen sin gel se adiciona 1 ml de solución 1000 mOsmol de sucrosa (17,12 gr de sucrosa disuelta en 50 ml de agua estéril deionizada) pre-calentada. La mezcla debe ser incubada a 37°C durante 60min. Después de ese tiempo se deposita una pequeña gota sobre un portaobjetos y se cubre con una lámina. La muestra es examinada con 400x por medio de contraste de fase. Deben contarse 100 células para evaluar la presencia de cola enrollada. Se registra el número de espermatozoides (expresado en %) con colas enrolladas (HOS+) de cada muestra (Nie y Wenzel, 2001). Lagares (1995) y luego Nie y Wenzel (2001) observaron que los espermatozoides equinos sufren la mayor sobrecarga osmótica en soluciones de 50 a 100 mOsmol.

VIII FACTORES QUE AFECTAN LA CONSERVACIÓN DEL SEMEN

8.1 CHOQUE TÉRMICO

El enfriamiento del semen disminuye la actividad metabólica de los espermatozoides, reduce el crecimiento bacteriano y, de esa manera, prolonga la viabilidad de los espermatozoides (Katila, 1997). El choque térmico, en equinos es el conjunto de alteraciones que los espermatozoides sufren cuando son sometidos a un enfriamiento rápido de 20°C a 5°C. Esas alteraciones están representadas por la pérdida rápida de motilidad, la alteración del tipo de motilidad con un movimiento retrógrado y circular, reducción del metabolismo, lesión del acrosoma y de la membrana plasmática, acompañada de pérdida de los componentes intracelulares. Estas alteraciones son en parte irreversibles (Amann y Pickett, 1987).

Las membranas de los espermatozoides están compuestas principalmente por una cadena doble de fosfolípidos distribuidos

aleatoriamente, en la cual se localizan complejos protéicos. Cuando están inalterados, se encuentran en estado fluido, esencial para su eficiente función. Con el enfriamiento, los lípidos sufren una transición a la fase líquida cristalina y posteriormente a una de gel. Una vez que se encuentran en estado de gel, los lípidos tienden a agregarse, formando microdominios en áreas aun fluidas. Estos lípidos agregados no se integran comúnmente con las proteínas asociadas con otros lípidos. Los bordes de estos microdominios se convierten en áreas más frágiles sujetas a la fusión o ruptura, además de volverse más permeables a los iones (Hemmersted y col., 1990; Amann y Gramham, 1993; Morel 1999).

Cuando los espermatozoides están alterados, los iones Na^+ y Ca^{++} que entran a las células espermáticas crece significativamente, superando la capacidad de eliminación de los iones por medio de las bombas de Ca^{++} . Así, el Ca^{++} se acumula en el espermatozoide alcanzando niveles tóxicos. Es posible que el acrosoma sufra más, con estas alteraciones, una pérdida mayor de capacidad fecundante de la que sería esperado de la reducción de la motilidad (Amann y Graham, 1993).

Los efectos del choque térmico son mas evidentes en el congelamiento de semen, cuando los espermatozoides sufren alteraciones mas semejantes a la capacitación y al envejecimiento (Amann y Graham, 1993). La severidad del efecto del choque térmico depende del grado de enfriamiento, intervalo entre temperaturas y la variación de la temperatura. Estos efectos pueden ser reducidos a través del enfriamiento controlando los intervalos críticos de temperatura entre 19°C y 8°C (Moran *et al* 1992) y por medio de la adición de lípidos (yema de huevo) o proteínas (leche) en el diluyente de semen.

8.2 PLASMA SEMINAL

El plasma seminal equino posee un perfil proteico característico de la especie divergiendo bastante del perfil bovino (Frazer y Bucci, 1996). Tiene una importante función en la modulación de la inflamación inducida por la monta. Inhibe la quimiotaxis y la fagocitosis de los polimorfonucleares, protegiendo de esta forma a los espermatozoides en el útero de la yegua (Katila, 2001;

Troedsson, 2004). La caracterización preliminar del componente inmunosupresivo sugiere que sería una o más moléculas con un peso molecular entre 50 e 100 kDa (Troedsson et al 2001). Participa también en el transporte espermático, dado que contiene oxitocina y prostaglandinas (Katila, 2001) y en la eliminación de los espermatozoides del tracto genital femenino. Es importante mantener un volumen mínimo de plasma seminal que module la inflamación de forma eficiente y proteja a los espermatozoides en el útero, sin interferir con su viabilidad cuando el semen es procesado para la criopreservación (Troedsson, 2004).

A pesar de sus diversas funciones no es el medio ideal para almacenar espermatozoides. El plasma seminal tiene efecto negativo sobre la motilidad espermática durante la conservación prolongada a bajas temperaturas, cuando fue empleado en una proporción superior a 20% (Varner *et al* 1987; Jasko y col., 1992; Pruitt *et al* 1993).

La fracción responsable por este efecto parece originarse en las vesículas seminales (Varner *et al* 1987). También fue sugerido que la variaciones de la composición (Aurich *et al* 1996) y la concentración de NaCl del plasma es responsable de la variación de la tolerancia del semen de diferentes sementales al enfriamiento y la congelación. El plasma seminal de los sementales presenta actividad de lipasa (Nishikawa, 1975).

Es posible que la actividad de la lipasa endógena en el plasma seminal de sementales, sea un factor adverso sobre los espermatozoides enfriados. La eliminación de la totalidad del plasma seminal, sin embargo, disminuye la motilidad después de 24h de enfriamiento (Jasko *et al* 1992). Los mismos autores recomendaron que 5% a 20% del plasma seminal sea mantenido. De acuerdo con Palmer (1984) y Braun *et al* (1994) la presencia de 0% a 10% de plasma seminal en el semen permite alcanzar superiores resultados que los alcanzados de 20% a 50%.

El plasma seminal prácticamente no tiene efecto sobre la motilidad de los espermatozoides criopreservados, si éstos fueron congelados inmediatamente después del procesamiento. Cuando el semen es incubado

con 20% de plasma seminal por un período prolongado, antes de ser congelado, el plasma seminal tiene un efecto perjudicial sobre la supervivencia espermática después de la criopreservación (Moore *et al* 2005). La proporción de plasma seminal del eyaculado puede ser reducida por medio de dilución, centrifugación o recolección fraccionada de las 3 primeras fases del eyaculado con una vagina artificial abierta (Katila, 1997).

La dilución del semen preserva la motilidad. Brinsko y Varner (1992) recomiendan una dilución mínima de 1 parte de semen con 1 parte de diluyente. Esta dilución es usada frecuentemente cuando las yeguas son inseminadas en el establecimiento, pocas horas después de la recolección. Al calcular la dilución ideal, la relación del diluyente con el plasma seminal debe ser considerada. Sin embargo, la dilución excesiva reduce la fertilidad debido al volumen. Si la concentración espermática inicial es baja, puede que no sea posible diluir el semen de manera proporcional, de manera que la proporción del plasma seminal sea reducida a 20%. Esto resultaría en un volumen excesivo y una concentración demasiado baja, reduciendo así la fertilidad (Katila, 1997).

Los espermatozoides de algunos sementales parecen ser más sensibles que otros a la presencia de plasma seminal. En estos animales más sensibles, disminuye el mantenimiento de la motilidad (Brinsko y Varner, 1992). La centrifugación y eliminación parcial del plasma seminal beneficia a los machos cuyos eyaculados presentan baja tolerancia al enfriamiento, almacenamiento, dilución del semen y acondicionamiento de rutina. Esto es válido en particular para semen almacenado por más de 24h. Este procedimiento, sin embargo, no se justifica para el semen de sementales, cuyos eyaculados toleran el enfriamiento y almacenaje usando procedimientos de rutina (Brinsko *et al* 2000).

7.2.1 CENTRIFUGACIÓN

El método más utilizado para la separación del plasma seminal de la fase rica en espermatozoides es la centrifugación. La misma permite la separación del plasma, aumenta la concentración espermática y también ofrece

un mayor control de la dilución utilizada en el semen enfriado o congelado. Especialmente en sementales, cuyo semen tiene baja capacidad de enfriado, “*poor cooler*”, la centrifugación y parcial eliminación del plasma seminal, puede conducir a una disminución de la pérdida de espermatozoides con motilidad rectilínea progresiva, cuando el semen es conservado durante más de 24h (Brinsko *et al* 2000). Sin embargo la centrifugación no es inocua. Además de una pérdida de 10% a 20% de los espermatozoides en el sobrenadante, puede reducir la motilidad o aumentar el número de alteraciones morfológicas de las células espermáticas, posiblemente como causa de la peroxidación (Parinaud *et al* 1997). Para reducir ese efecto se puede disminuir la fuerza centrífuga, acortar el tiempo de centrifugación, usar diluyentes en la centrifugación y usar una solución isotónica densa (Pickett *et al* 1975; Martin *et al* 1979; Cochran *et al* 1984).

Para congelar el semen se agrega, comúnmente, un diluyente a base de glucosa-EDTA (Martin *et al* 1979) o citrato-EDTA (Cochran *et al* 1984) para la centrifugación. Después, el pellet de semen se resuspende con un segundo diluyente para el almacenamiento o criopreservación. Cuando el semen esta destinado a ser utilizado fresco o enfriado se emplea solo un diluyente (Tablas 3, 6) para la centrifugación y resuspensión, ya que no se lleva a cabo la criopreservación.

El diluyente puede ser mezclado con el semen y colocado en fracciones. Importante es que sea pre-calentado para estar a la misma temperatura que el semen. La proporción semen/diluyente normalmente utilizada es de 1:1 a 1:2, hasta > 1:3 (Aurich, 2005). Cochran *et al* (1984), además de usar el diluyente citrato-EDTA, también utilizan 0,25 ml de una solución densa de EDTA-glucosa en el fondo del tubo de centrifuga como amortiguador, obteniendo mejor motilidad. Volkmann y Van Yzl (1987) basados en los resultados pos descongelamiento, no se observaron ventajas de este procedimiento. Pickett y Amann (1993) sugirieron que el uso de diluyente con lactosa-EDTA-yema de huevo con o sin 4% de glicerol fue tan eficiente como cuando se empleó una solución densa de glucosa. Existe una gran variación en la fuerza centrífuga y la velocidad utilizada por los autores. Martin *et al* (1979) usaron 1000g durante 5min y Klug (1993) 800g 10min. Otros autores emplearon una fuerza centrífuga

menor durante un período mayor: 400g, 12min (Brinsko et al 2000), 400g, 15min (Cochran *et al* 1984; Bedford *et al* 1995).

8.3 DILUYENTES

Los diluyentes de semen contienen componentes protectores que permiten la sobrevivencia espermática fuera del tracto reproductivo. Además de esto aumentan el volumen de la dosis inseminante.

Yema de huevo, leche y glicerol son los componentes mas adicionados para la protección de 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 (Brinsko y Varner, 1992). El metabolismo de los espermatozoides produce sustancias tóxicas, como ácido láctico, que reduce la motilidad. Los diluyentes deben contener sustancias con alta capacidad tampón para neutralizarlos (Katila, 1997).

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. No deben usarse para compensar falta de higiene en la recolección o procesamiento de semen. Como se muestra en la tabla 3, los antibióticos mas empleados son la penicilina G-potásica o sódica cristalina, la gentamicina o amikacina, la estreptomycinina o penicilina G-potásica cristalina. La combinación de penicilina G-potásica cristalina con amikacina fue mas eficaz en el control de bacterias anaerobicas (NOM-027-ZOO-1995).

Una alternativa promisor para el uso de antibióticos es la adición de manosa al diluyente. Por medio de la inhibición competitiva de la adherencia bacteriana disminuye la adherencia de las bacterias a la mucosa uterina de yeguas. Diluyente conteniendo hasta 37 mg/ml de manosa mantuvieron la motilidad espermática y la misma capacidad fecundante, que el semen en diluyentes tradicionales. Concentraciones de 25 mg/ml de manosa preservaron la motilidad bajo refrigeración durante 48 horas (King y col., 2006).

La presión osmótica y el pH del diluyente deben ajustarse para favorecer la sobrevivencia espermática. La osmolaridad del plasma seminal es de 300mOsm/l aproximadamente (Katila, 1997). Mantener la osmolaridad del diluyente próxima a la isotonicidad (entre 277 y 322 mOsm/Kg) favorece la motilidad espermática *In Vitro* (Meirelliers *et al* 1999). La osmolaridad de los diluyentes a base de leche puede variar entre 300 y 400 mOsm/l, el valor ideal es de 350 mOsm/l. El pH de los diluyentes puede variar entre 6.7 y 7.2 sin afectar la calidad espermática durante el almacenamiento. Por este motivo, cuando la gentamicina o ampicilina, que reducen el pH del medio son incluidos en el diluyente debe ser adicionado bicarbonato de sodio para ajustar el pH (Brinsko y Varner, 1992).

IX PROCESAMIENTO DE SEMEN

El semen para IA generalmente está disponible *in natura* (fresco), enfriado o congelado. El método del procesamiento determina su periodo de viabilidad. Aunque muchos trabajos fueron realizados sobre conservación de semen, es frecuente el empleo de un número experimental pequeño, fallas en la descripción de la metodología como del registro de los resultados. Además de esto la interacción de diversas variables torna difícil la interpretación de los resultados. Es común también que los trabajos con diluyentes y almacenamiento, debido a los altos costos se basen más en la evaluación de la motilidad que los resultados de la inseminación (Palma 2008)

9.1 SEMEN FRESCO

El semen *in natura* es utilizado ocasionalmente en la inseminación artificial, a pesar de que de esta forma no se aprovecha integralmente las ventajas de la IA. Esta práctica es utilizada especialmente cuando las yeguas se encuentran en la misma propiedad que el semental o son llevadas hasta donde se encuentra también por alteraciones físicas de la yegua o del macho, que impiden la monta natural. Cuando se utiliza semen fresco en la IA es importante que la misma sea realizada hasta 30 min después de la recolección, por que ocurre pérdida rápida de motilidad y la capacidad fecundante del semen diluido. Como en este caso el volumen del semen corresponde al del eyaculado, lo que varía es la dosis inseminante que puede ser determinada por las siguientes fórmulas (Klug, 1993):

$$\text{Volumen de la dosis} = \frac{\text{Volumen del eyaculado}}{\text{N}^\circ \text{ de dosis}} \quad \text{ó} \quad \frac{\text{Volumen del eyaculado}}{\text{N}^\circ \text{ de yeguas a ser inseminadas}}$$

Si la IA fue realizada hasta dos horas después de la recolección, es aconsejable una dilución del semen de 1:1 o 1:2 (Brinsko y Varner, 1992; Katila, 1997^a). Para esta finalidad, generalmente es utilizado un diluyente a base de leche descremada en polvo. (Tabla 3).

Los resultados de la IA con semen fresco son semejantes (Vidament y col., 1999) o aún superiores a los obtenidos con la monta natural (Mattos y Cavalheiro, 1998). Estos autores obtuvieron, con el semen diluido, una tasa de preñez/ciclo superior (78.7%) que con la monta natural (56.0%), sobre 5300 ciclos, usando semen fresco diluido o no, tampoco se observaron diferencia alguna en la tasa de preñez, después de la IA con semen fresco diluido o no. (Silva Filhom *et al* 1994).

9.2) SEMEN REFRIGERADO

La preservación de semen equino en forma líquida es actualmente más rentable económicamente que el semen congelado. Esto se debe al elevado costo del equipamiento para la congelación y la baja fertilidad del semen congelado de una gran parte de los sementales (Varner *et al* 1989). Índices de preñez aceptables junto a la posibilidad de preservar el semen por períodos que varían de varias horas a días, convirtieron la IA con semen refrigerado una técnica ampliamente difundida (Brinsko y Varner, 1992).

Entre las dificultades del uso del semen refrigerado se puede enumerar:

- No todos los sementales producen semen que tolera la refrigeración y conservación.
- Dificultades en la logística pueden provocar que la inseminación se realice fuera del momento adecuado.
- El manejo de las yeguas es transferido al propietario o veterinario local, muchas veces con poca experiencia.
- La longevidad del semen refrigerado es relativamente corta (24-48h) puede ser necesario varios envíos por ciclo.
- Los sementales deben estar saludables y disponibles para las recolecciones de semen, durante toda la temporada de monta (servicio) para atender a la demanda de los criadores.
- El semen muchas veces es procesado por los propietarios, no profesionales, lo que lleva a una amplia variabilidad en la calidad del semen transportado (Loomis, 2001a).

9.2.1 DILUYENTES PARA SEMEN REFRIGERADO

Los diluyentes a base de leche descremada en polvo como Kenney o E-Z Mixin (Tabla 3) son usados comúnmente para la dilución de semen para la IA, tanto como semen fresco como refrigerado, por mantener bien la motilidad espermática y la fertilidad. Además de esto, son de preparación simple y de bajo costo. La ausencia de partículas de grasa torna a estos diluyentes óptimamente claros, razón por la cual pueden ser utilizados bien en la evaluación de semen (Mattos 2000).

La versión más simple, el diluyente de leche descremada, requiere del calentamiento a 92°C – 95°C durante 10 minutos. Esto es necesario para inactivar la lactenina, un componente de la leche, tóxico para los espermatozoides (Householder *et al* 19871). La utilización de leche descremada en polvo o leche UHT/UAT (ultra high temperature, ultra alta temperatura) en diluyentes no requiere de la inactivación de la lactenina, lo cual probablemente ocurre cuando estos productos son procesados (Meirelles *et al* 1998).

La leche descremada UHT (Meirelles *et al* 1998) o la leche descremada en polvo reconstituida (10g de leche en polvo con 0.1% de grasa en c.s.p. 100 ml de agua destilada (Meirelles *et al* 1999) pueden ser utilizados como diluyentes para la preservación de semen equino refrigerado. También se sugiere que sean evaluadas diversas marcas, tanto de leche descremada en polvo como UHT, porque existen variaciones en los resultados obtenidos entre marcas. Esto es atribuido a diferencias en la composición de estos productos, debido a la presencia de aditivos (Mattos 2000)

Como se puede observar en la tabla 3, la composición del diluyente de Kenney y E-Z Mixin (disponibles comercialmente) es semejante. Después de 34h de refrigeración a 4°C en diluyente de Kenney la motilidad total se mantuvo en 80% y el movimiento progresivo en 72% (Varner *et al* 1989). Después de 96h a esta temperatura, la motilidad total y progresiva fueron de 39% y 33% respectivamente (Varner *et al* 1988). Se obtuvieron mejor mantenimiento de la motilidad espermática con diluyente a base de leche descremada en polvo-glucosa que con el empleo de leche descremada (Province *et al* 1985). El uso de glucosa, una fuente extra de energía y bicarbonato, un tampón en los diluyentes Kenney y E-Z Mixin pueden ser los factores responsables de la mejor conservación de la motilidad rectilínea progresiva y de mejores índices de concepción obtenidos con estos diluyentes, frente a la leche descremada (Morel, 1999).

La eliminación del plasma seminal y la dilución del semen con un diluyente de leche descremada-glucosa (EZ Mixin), conteniendo medio Tyrode

modificado, pueden mejorar la motilidad espermática y los índices de preñez en el caso del semen refrigerado. La presencia de plasma seminal en el medio de Tyrode disminuye la motilidad espermática (Rigby et al 2001).

Se cree que la gelatina presente en algunos diluyentes, puede tener una función estabilizadora de la membrana. A pesar que la obtención de buenos resultados de preñez (Householder *et al* 1981) diluyente a base de gelatina (tabla 4) no son utilizados comercialmente debido a que su preparación es más trabajosa y la presencia de partículas de grasa no permiten la evaluación microscópica del semen (Ticket, 1993).

El diluyente INRA 96 (Tabla 5) es un diluyente químicamente definido que incluye componentes de la leche. Mantiene la viabilidad espermática a 15 °C por un período mayor que el diluyente INRA 82. Semen diluido con INRA 96, manteniendo a 15°C durante 72h resultó en 48% fertilidad/ciclo. Este diluyente es una alternativa para ser empleada en sementales con espermatozoides sensibles al choque térmico (Batallier *et al* 1998).

Los diluyentes a base de yema de huevo son usados principalmente para la conservación de semen, por que su opacidad óptica dificulta la evaluación microscópica. Su acción protectora es atribuida a la fracción lipoproteica de baja densidad, los fosfolípidos que se ligan a la membrana plasmática. Semen diluido en diluyente Dimitropulos (Tabla 6) alcanzó 56% y 41% de motilidad, después de la conservación a 5°C durante 24h y 48h respectivamente (Ijaz y Ducharme, 1995).

Está indicada la eliminación del plasma seminal, porque ocurre una interacción adversa entre el plasma seminal y la yema de huevo. Este efecto se manifiesta después de 6h de refrigeración como una detención de la motilidad espermática y después de 24h también como una falta de la motilidad total (Bedford *et al* 1995). Este efecto no fue observado cuando la yema de huevo fue utilizada en una cantidad de 2% (Amann y Pickett, 1987).

9.2.2 DILUCIÓN, VOLUMEN Y DOSIS UTILIZADOS CON SEMEN REFIGERADO

El semen debe ser mezclado con el diluyente pre-calentado (37°C 2 a 5 minutos después de la eyaculación. La relación semen:diluyente debe ser un mínimo de 1:1. Si el semen se almacenará por un periodo superior a 2 a 4h antes de la inseminación, normalmente se utiliza una dilución mayor. La dilución va a depender de la concentración espermática inicial. La concentración final de semen diluido de 25 a 50 x 10⁶ espermatozoides/ml favorece la sobrevivencia espermática *in Vitro* (Varner *et al* 1987).

En los programas de IA, las yeguas son generalmente inseminadas con dosis que varían de 250 a 500 x 10⁶ espermatozoides con movimiento progresivo (Brinsko y Varner, 1992), Gahne *et al* (1998) verificaron que no hay diferencia en la tasa de preñez con dosis de 300 y 500 x 10⁶ espermatozoides con motilidad progresiva, cuando fue empleado semen de buena calidad, diluido y mantenido durante 24h a 20°C. Cuando se estableció el número de espermatozoides en cada dosis, se puede determinar el número de dosis/eyaculado y luego el volumen final después de la dilución (Klug, 1993):

$$\text{N}^\circ \text{ dosis} = \frac{\text{N}^\circ \text{ total de espermatozoides} \times \% \text{ de movimiento progresivo}}{100 \times \text{n}^\circ \text{ espermatozoides/dosis}}$$

$$\text{Volumen final después de la dilución} = \text{n}^\circ \text{ de dosis} \times \text{volumen de la dosis}$$

Cuando es utilizada una dilución 1:1; 1:2, etc. después de la dilución el volumen de las dosis puede ser determinado de la siguiente forma (Klug, 1993):

$$\text{Volumen de la dosis} = \frac{\text{Volumen de semen} + \text{volumen de diluyente}}{\text{N}^\circ \text{ de dosis}}$$

Brinsko y Varner (1992) determinaron el volumen de la dosis inseminante usando la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen de la dosis} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de espermatozoides con motilidad progresiva/dosis}}{\text{Concentración espermática/ml} \times \% \text{ motilidad progresiva}}$$

9.2.3 ENVASE DEL SEMEN REFRIGERADO

El semen diluido puede ser mantenido en probetas u otros recipientes de vidrio o plástico que no sean tóxicos para los espermatozoides. Las dosis son divididas en el momento de la inseminación. El semen puede ser almacenado también en bolsas de polietileno (Douglas-Hamilton y col., 1984) o en jeringas con émbolos de plástico. Esto es especialmente importante si el semen es almacenado por más de 30 minutos en la jeringa. Algunos émbolos de goma liberan sustancias tóxicas para los espermatozoides (Broussard 1990).

Douglas-Hamilton *et al* (1984) recomiendan que el aire sea retirado de los embalajes, durante el llenado con semen. A 4°C la actividad espermática es menos intensa y una mejor motilidad fue mantenida en los envases sin aire, comparada con aquella que contenían aire. La agitación del semen diluido mantenido a 4°C también prolonga significativamente la motilidad (Mattos *et al* 1997).

Independientemente del tipo de envase a ser utilizado, es de fundamental importancia identificar correctamente los envases con el nombre del semental donante y la fecha de recolección. Esto es especialmente importante cuando en el mismo lugar es realizado el procesamiento del semen de otros machos (Broussard 1990).

Tabla 3. Composición de diversos diluyentes a base de leche descremada (NOM-027-ZOO-1995)

Diluyente	Componentes	Cantidades	
Leche descremada en polvo-glucosa de Kenney I (Kenney y col., 1975)	Leche descremada en polvo	2.4 g	
	Glucosa	4.9 g	
	Penicilina cristalina	150,000 U	
	Estreptomocina cristalina	150,000 ug	
	Agua destilada estéril	c.s.p 100ml	
	Leche descremada en polvo	2.4 g	
	Glucosa	4.9 g	
	NaHCO ₃ (7,5%)	2.0 ml	
	Gentamicina, sulfato (PA)	2.0 ml	
	Agua destilada estéril	92 ml	
Mezclar primero los componentes líquidos y luego agregar los componentes en polvo			
E-Z Mixin (Province y col., 1984, 1985)	Leche descremada en polvo	2.4 g	
	Glucosa monohidratada	4.9 g	
	NaHCO ₃	2.0 ml	
	Sulfato de polimixina B 50mg/ml	2.0 ml	
	Agua destilada estéril	92.0 ml	
Mezclar primero los componentes líquidos y luego agregar los componentes en polvo			
INRA 82 (Magistrini y col., 1992; Ijaz y Ducharme, 1995)	Glucosa	5.0 g	
	Lactosa	300.0 g	
	Rafinosa	300.0 g	
	Citrato trisódico deshidratado	60.0 g	
	Citrato de potasio	82.0 mg	
	HEPES	952.0 mg	
	Penicilina	10.0 UI/ml	
	Gentamicina	10.0 Ug/ml	
	Agua	100.0 ml	
	Leche UHT descremada	100.0 ml	
Tyrode modificado por Kenney (Ijaz y Ducharme, 1995)	Glucosa	4.9 g	
	Leche descremada en polvo	2.4 g	
	Penicilina sódica	150,000 UI	
	Dihidroestreptomocina	150.0 mg	
	Agua destilada	c.s.p 100ml	
	Adicionar 65% del diluyente Kenney a 35% (v/v) de medio de Tyrode		
	NaCl	420.0 mg	
	KCl	187.0 mg	
	Na ₂ HCO ₃	210.0 mg	
	Lactato de sodio 98%	190.0 ul	
	CaCl ₂	29.0 mg	
	<i>Medio Tyrode</i>	MgCl	8.0 mg
		HEPES	238.0 mg
		Piruvato de sodio	11.0 mg
	Albúmina Sérica Bovina libre de ácidos Grasos (BSA AFF)	600.0 ml	
	Agua	100 ml	

Tabla 4. Composición de un diluyente a base de crema de leche y gelatina

DILUYENTE	COMPONENTES	CANTIDADES
Crema de leche-gelatina (Voss y Pickett, 1976)	Gelatina	1.3 g
	Agua destilada	10.0 ml
	Crema de leche (<i>half and half</i>)	90.0 ml
	Penicilina	100,000 UI
	Estreptomina	100,000 UI
	Sulfato de polimixina B	20,000 UI

Mezclar la gelatina con el agua destilada y autoclavar por 20 min. Calentar la crema de leche a 92-95°C por 10 min. Después quitar la espuma de la crema de leche calentada, adicionar la solución de gelatina en c.s.p 100 ml

Tabla 5. Composición del diluyente INRA96 (NOM-027-ZOO-1995)

DILUYENTE	COMPONENTES	CANTIDADES
INRA96 (Batellier y col., 1998)	Sales de Hank's, 67 mM Glucosa en	
	126 mM de lactosa	
	CaCl ₂	0.14 g
	KCl	0.4 g
	KH ₂ PO ₄	0.06g
	MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2 g
	NaCl	1.25 g
	Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O	0.118 g
	NaHCO ₃	0.35 g
	HEPES	4.76 g
	Glucosa	13.21 g
	Lactosa	45.39 g
	Agua destilada	c.s.p 1000 ml
	Suplementar con fosfocaseinato natural	27 g/l

Tabla 6. Composición del diluyente que contiene yema de huevo (NOM-027-ZOO-1995)

DILUYENTE	COMPONENTES	CANTIDADES
Dimitropoulos (De Vries, 1987; Ijaz y Ducharme, 1995)	Solución A	
	Glucosa anhidra	2.0 g
	Fructosa	2.0 g
	Agua destilada	100 ml
	Solución B	
	Citrato de sodio dihidratado	2.0 g
	Glicina	0.94 g
	Sulfonamida	0.35 g
	Agua destilada	100 ml
	Yema de huevo	20.0 ml

Preparar las soluciones A y B separadamente y después mezclar 30 ml de la solución A y 50 ml de la solución B. agregar la yema de huevo y centrifugar 20 min. A 1200 g. usar el sobrenadante como diluyente.

9.2.4 REFRIGERACIÓN PARA EL SEMEN REFRIGERADO.

De una forma general, la refrigeración del semen diluido a temperaturas de 5°C a 6°C mantienen mejor la viabilidad espermática durante el almacenamiento en comparación con el mantenimiento a temperatura ambiente (15-25°C). Este aumento de la viabilidad espermática es favorecido por la mayor reducción de la actividad metabólica a temperaturas bajas. Durante el enfriado, sin embargo, los espermatozoides están expuestos a los efectos negativos del choque térmico. La extensión de ese efecto adverso sobre los espermatozoides no depende tanto de la temperatura sino más de la velocidad con que desciende. No se observaron, una disminución significativa del semen enfriado 1°C/min hasta 4°C. (Mattos *et al* 1997).

La mayoría de los autores concuerdan que el enfriamiento lento (<0.03°C a 0.1-0.05°C/min) mantiene mejor la motilidad y la fertilidad de los espermatozoides equinos (Douglas-Hamilton, 1984; Varner *et al* 1988; Kayser *et al* 1992). El semen diluido puede ser enfriado rápidamente de 37°C a 20°C. La fase crítica, de mayor susceptibilidad de los espermatozoides al choque térmico, se encuentra en el intervalo entre 19°C y 8°C hasta la temperatura de almacenamiento, que varía entre 6°C y 4°C (Moran *et al* 1992).

La curva de enfriamiento se puede llevar a cabo con la ayuda de unidades de refrigeración como los contenedores para el almacenamiento y transporte de semen equino, disponibles en el mercado. Un ejemplo es el Equitainer ® (Mintüb, Alemania), que permite el enfriamiento inicial lento (0.3°C/min) y mantiene la temperatura final de 4°C a 6°C por más de 36 horas aproximadamente (Douglas-Hamilton *et al* 1984). Una curva de enfriamiento semejante, aproximadamente 0.3°C/min puede ser obtenida colocando el semen en un baño María a temperatura ambiente y colocando en una refrigeradora a 5°C El uso de unidades computarizadas de refrigeración permiten un control mejor sobre la curva de enfriamiento. Sin embargo las refrigeradoras y los contenedores de transporte son los más empleados (Squires *et al* 1999).

9.2.5 TEMPERATURA Y TIEMPO DE ALMACENAMIENTO DEL SEMEN REFRIGERADO

El semen mantenido entre 10°C y 20°C presenta con frecuencia reducción de la fertilidad, después de 12h a 24h (Brinsko y Varner, 1992). A pesar que Varner *et al* (1989) no observaron diferencia entre la capacidad de fecundación del semen diluido, mantenido a 20°C frente a 5°C durante 24h, se observó una disminución más acentuada de la motilidad total y progresiva del semen almacenado a 20°C que a 5°C. Los espermatozoides de reproductores fértiles, conservados a 5°C en diluyente a base de leche, mantuvo la calidad de la cromatina durante 46 horas, mientras que el almacenamiento a 20°C y 37°C resultó en la desnaturalización moderada y acentuada del ADN, respectivamente (Varner *et al* 1988).

El semen de sementales subfértiles presenta mayor susceptibilidad a la desnaturalización o a disminución de la calidad de la cromatina entre 20 y 31 horas a 5°C (Love *et al* 2001; Love *et al* 2002). Se observó una pequeña diferencia en la recuperación de embriones de 51% y 59%, después de la IA con semen mantenido durante 24h a 20°C y 5°C respectivamente (Pickett 1993).

Después de 48h de almacenamiento no se recolectaron embriones de yeguas inseminadas con semen mantenido a 20°C, mientras que con semen mantenido a 5°C, la tasa de recolección fue de 32%. Por esa razón, la conservación de semen a 20°C es viable a un plazo máximo de 24h. Si está previsto exceder ese período, se recomienda refrigerarlo. El semen diluido y mantenido a temperatura de 4°C a 6°C mantiene normalmente la capacidad fecundante de las células espermáticas durante 24 a 48h o más. Tasas normales de fertilidad fueron alcanzadas después de almacenamientos de 72h y 96h (Brinsko y Varner, 1992).

9.2.6 TRANSPORTE DEL SEMEN REFRIGERADO

A fin de mantener las ventajas obtenidas con la refrigeración del semen, es necesario que su almacenamiento y transporte sean realizados a la misma temperatura. El Equitainer® (Mintüb, Alemania) fue el primer contenedor

desarrollado para esa finalidad y es el más usado en la actualidad para el transporte de semen equino refrigerado. El semen debe ser diluido en una relación mínima de 1:2. (Douglas- Hamilton *et al* 1984).

Actualmente existen en el mercado otros contenedores como el *Expect a Foal*®, *Equine Express*®, *Celle* y *Sarstedt*®. Todos estos modelos son adecuados para la refrigeración y el transporte de semen equino durante 24h (Katila *et al* 1997). Para una conservación de 48h o a temperaturas ambientales más extremas, el modelo *Equitainer*® es el más indicado (Katila, 1997a; Malmgren, 1998, Brinsko *et al* 2000b).

9.2.7 CONCEPCIÓN UTILIZANDO SEMEN REFRIGERADO

La tasa de preñez está afectada por diversos factores. Ello hace muy difícil contar con una media general de preñez con semen refrigerado. Algunos de estos factores son la calidad del semen utilizado, una o más inseminaciones por cada ciclo, diluyentes utilizados, concentración espermática en la dosis, lugar (estándar o intrauterina profunda) y tiempo de conservación, entre otros. Generalmente el semen refrigerado y conservado por más de 24h permite obtener tasas de preñez más bajas que las obtenidas con semen fresco (Morel, 1999).

Palmer (1984) observó resultados similares con la monta natural y la IA con semen refrigerado durante 8h. La variación acentuada, observada en la calidad del semen refrigerado y transportado en un programa comercial de IA resultó en 48% tasa de preñez/ciclo media. Con semen de excelente calidad se alcanzó 87,5% de preñez/ciclo y con semen de mala calidad 11,0% (Metcalf, 1998).

9.3 SEMEN CONGELADO

La criopreservación de semen implica su almacenamiento a temperaturas bajo 0°C. El nitrógeno líquido es (-196°C) utilizado, normalmente, para este fin. Si los espermatozoides resisten los procesos de congelación y descongelación, la integridad puede ser mantenida indefinidamente en nitrógeno líquido, porque la actividad es considerada insignificante a esa temperatura (Brinsko y Varner, 1992).

El problema es que, aún utilizando las técnicas más avanzadas de criopreservación, la sobrevivencia espermática, después de la descongelación, está limitada a 50% (Watson, 1995). Además de esto, las técnicas de congelación de semen equino son menos eficaces que las de la especie bovina (Brinsko y Varner, 1992).

Otro factor, que afecta los resultados de la IA con semen congelado/descongelado es la variación en la congelabilidad del semen entre sementales. Fue estimado que 25% a 30% de los sementales producen semen que tolera satisfactoriamente, 25% a 50% producen semen con tolerancia moderada y 25% a 40% producen semen con baja tolerancia a la congelación (Pickett y Amann, 1993).

Por ese motivo muchos programas comerciales de IA con semen congelado establecen valores mínimos para que los machos sean incluidos como donantes de semen. Klug *et al* (1977) solo congelaron eyaculados de alta calidad con una concentración de $0,47 \times 10^6/\text{mm}^3$ y una motilidad total de 75%. Los valores mínimos exigidos para la congelación de semen equino en las haras nacionales de Francia en 4 eyaculados recolectados en días consecutivos son: concentración: $>120 \times 10^6$ espermatozoides/ml, motilidad inmediatamente después de la recolección: $> 70\%$ y motilidad después de 24h a 4°C: $> 40\%$ (Vidament *et al* 1999).

De esta forma, en un emprendimiento comercial, se pueden obtener tasas de preñez semejantes, utilizando semen congelado o refrigerado (Loomis, 2001a). Los factores que limitan el desarrollo de la industria de semen

congelado equino, además de la menor fertilidad en comparación con el refrigerado en diversos sementales, son el mayor costo asociado con el manejo más intenso de las yeguas (más exámenes son necesarios, debido a la menor viabilidad del semen congelado en la yegua, lo que requiere mayor sincronía entre la inseminación y la ovulación, para economizar dosis), el marketing desfavorable del semen congelado (si es comercializado con un número limitado de dosis disponibles por ciclo, el costo del manejo de la yegua es más alto que con semen refrigerado), es necesario mayor conocimiento técnico para el procesamiento de semen congelado que el semen refrigerado. Mayor costo de transporte del contenedor de semen congelado que el refrigerado y la selección de las yeguas debe ser más estricta para la IA con semen congelado (Loomis, 2001a).

Los beneficios adicionales del semen son: el acceso al semen de machos reproductores que están distantes, en competencia, enfermos, lesionados o con una demanda excesiva durante la temporada de monta o hasta muertos, no impide la inseminación de las yeguas con semen congelado. La ventaja de poder organizar los envíos de semen, que puedan ser enviados con anticipación y mantenidos en la propiedad hasta el momento adecuado para la inseminación. Su posibilidad de distribución internacional. El procesamiento centralizado en laboratorios resulta en una menor variabilidad de la calidad del semen. Se desperdicia menos semen, porque todo lo que se recolecta para la congelación es procesado y almacenado, resultando en una media de 10 a 12 dosis por cada eyaculado. Mientras que para distribuir el semen refrigerado con frecuencia a los sementales se les extrae el semen para enviarlo a 1 ó 2 yeguas y el material restante es descartado (Loomis, 2001a; Loomis y Squires, 2005).

9.3.1 PRINCIPIOS DE CRIO PRESERVACIÓN

Los espermatozoides criopreservados sufren una gran sobrecarga asociada a la congelación/ descongelación. Esta sobrecarga está relacionada con los cambios de temperatura, la formación de cristales de hielo y sus consecuencias sobre las células espermáticas (Watson, 1995). La mayoría de las alteraciones de la estructura de la membrana son consecuencia de shock

térmico, deshidratación, toxicidad de las sales, formación de hielo intracelular, fluctuaciones del volumen/superficie celular o alteraciones del equilibrio metabólico (Brinsko y Varner, 1992).

La primera etapa a cumplir es la refrigeración, desde la temperatura corporal hasta 5°C, intervalo en que los espermatozoides son sensibles al choque térmico. Cuando la temperatura desciende por debajo del punto de congelación, ocurre un fenómeno conocido como *supercooling*, antes que haya formación de cristales de hielo. La cristalización libera calor residual que eleva la temperatura de la solución. Esta elevación de temperatura puede tener efectos adversos sobre las células. Los efectos pueden ser reducidos, utilizando una curva de congelación adecuada (Graham, 1996).

El uso de técnicas de seeding y vitrificación, con la finalidad de evitar el supercooling no resultaron en beneficios evidentes (Watson, 1995). Cuando el semen, diluido en un medio con glicerol, alcanza -6°C a -15°C se forman cristales de hielo en el medio extracelular. Esos cristales están compuestos exclusivamente de agua y los solutos (sales, proteínas, azúcares, etc.) disueltos, permanecen en la fracciones no congeladas. A la temperatura del nitrógeno líquido, hay canales de agua no congelada con concentración más alta de solutos. El volumen de esta fracción no congelada es muy importante porque solamente espermatozoides presentes en estos espacios sobreviven a la criopreservación (Amann y Pickett, 1987).

Por lo tanto la criopreservación de espermatozoides en concentraciones demasiado altas para permitir que las células permanezcan en esos espacios descongelados, disminuye el porcentaje de espermatozoides que sobreviven a la congelación (Graham, 1996).

Los solutos concentrados de la fracción líquida remanente someten a las células a la deshidratación osmótica, dependiendo de la velocidad de congelación y de la permeabilidad de las membranas celulares al agua. Los espermatozoides tienen una gran sensibilidad a variaciones osmóticas, lo que puede ser el factor más determinante de la proporción de células espermáticas que sobrevivan a la criopreservación (Watson, 1995).

Los espermatozoides equinos toleran aproximadamente 11% de reducción y 20% de aumento de su volumen isoosmótico, manteniendo más del 70% su mayor motilidad original. A pesar que la mayoría de los espermatozoides son capaces de recuperar el volumen inicial, después del estrés osmótico, no son capaces de recuperar la motilidad inicial y ni potencial de la membrana mitocondrial. La permeabilidad de la membrana plasmática varía conforme a la región del espermatozoide (Meyers *et al* 2004).

Alteraciones de la membrana, resultantes de la disminución y aumento del volumen causan lesiones irreversibles de la membrana plasmática y organelas celulares, causando disturbios en la función celular de los espermatozoides, que provoca la pérdida de su capacidad fecundante después de la criopreservación (Pommer *et al* 2002).

El efecto de la criopreservación depende de la curva de congelación. Antes de la congelación los espermatozoides son isotónicos como el medio de criopreservación. Si el semen fuera congelado a una velocidad moderada (-25°C a -40°C/min), el agua no congelada en el interior de los espermatozoides se difundirá al medio extracelular, debido a la mayor concentración de solutos en la fracción no congelada de éste. Si la velocidad de congelación es lenta, los espermatozoides se deshidratan y no se forman cristales grandes de hielo (Amann y Pickett, 1987).

Este procedimiento resulta, sin embargo, en elevadas concentraciones intracelulares de solutos que pueden dañar a los espermatozoides. Si el semen fuera enfriado rápidamente (> -60°C/min) el agua intracelular no dispondría de tiempo suficiente para difundir fuera de la célula antes de congelarse, formándose cristales intracelulares menores. La formación inicial de hielo intracelular puede resultar en lesión celular, pero es más grave si éstos se disuelven y vuelven a formar cristales más grandes en el interior de las células espermáticas (Graham, 1996).

La reversión de este proceso debe ocurrir durante la descongelación (Watson, 1995). La descongelación puede ser más perjudicial para los espermatozoides que el proceso de congelación (Pommer *et al* 2002).

La alteración funcional pronunciada de las membranas es la mayor razón de la pérdida del movimiento rectilíneo progresivo, observado después de la descongelación (Neild *et al* 2003).

Cuando el semen alcanza temperaturas por debajo del rango de temperatura crítico (-15°C a -60°C), los espermatozoides se tornan relativamente inertes y pueden ser transferidos al nitrógeno líquido para su almacenamiento. En este momento las células son menos susceptibles a lesiones inducidas por las altas concentraciones de sales. Los espermatozoides pueden ser conservados por tiempo indeterminado a esta temperatura (Watson, 1995).

Las sustancias crioprotectoras pueden ser incorporadas al medio para proteger los espermatozoides durante la congelación. Los crioprotectores son clasificados como penetrantes y no penetrantes de la membrana plasmática. El glicerol es el crioprotector penetrante más utilizado en la congelación de semen equino. Actúa intra y extracelularmente en la protección de las estructuras celulares. Aumenta el volumen de los espacios congelados y diluye las altas concentraciones de sales (Amann y Pickett, 1987).

Otro crioprotector usado en menor escala es el DMSO (Chenier *et al* 1988). La dimetil formamida al 2% (Vidament *et al* 2002) ó 5% (Gomes *et al* 2002; Alvarenga *et al* 2004a) y otras amidas (metil formamida, dimetilacetamida) (Medeiros *et al* 2002) también protegen a los espermatozoides equinos de los daños de la congelación en forma tan eficiente como el glicerol, (Squires *et al* 2004).

En sementales, cuyo semen presentó baja tolerancia a la congelación, el empleo de amidas resultó en una mayor calidad del semen después de la descongelación que con glicerol (Gomes *et al* 2002; Medeiros *et al* 2002; Alvarenga *et al* 2004a). Como estos compuestos atraviesan la membrana en forma más eficaz que el glicerol, causan menor daño osmótico que éste último.

Por lo tanto pueden ser crioprotectores alternativos muy eficientes para la criopreservación de semen equino. Particularmente a tener en cuenta en aquellos sementales que producen semen de baja calidad a la descongelación, cuando el glicerol fue usado como crioprotector (Squires *et al* 2004).

Crioprotectores no penetradores como la lactosa y lipoproteínas de la yema de huevo, actúan sólo en el compartimento extracelular. No se conoce aún exactamente el mecanismo de acción de estos 2 tipos de crioprotectores (Hammsted *et al* 1990). La adición de concentraciones elevadas de crioprotectores es tóxica para los espermatozoides, los cuales pueden sufrir una reducción de la fertilidad. Por ese motivo deben ser empleados manteniendo un equilibrio que proporcione el máximo de protección con mínimo efecto tóxico (Graham, 1996).

Otro aspecto importante es el volumen y la relación superficie/volumen que afectan la congelación del semen. Muestras con un volumen mayor, congelan más lentamente que la de menor volumen, cuando son sometidas a temperaturas iguales. Muestras con una relación superficie/ volumen alta, congelan en forma más uniforme que aquellas en las cuales la relación es menor. Células en la superficie de la muestra se enfrían más rápidamente que las que se encuentran en el interior. Por esto, cuando el volumen de la muestra es grande, la disparidad entre la congelación de la superficie y el centro de la muestra puede ser importante (Graham, 1996).

La velocidad de descongelación de semen depende de la velocidad con que éste fue congelado. Semen congelado a una velocidad moderada exige una descongelación de la misma forma. En este caso el hielo intracelular difunde lentamente a los solutos de la fracción no congelada. Esto permitirá que el agua se difunda lentamente al interior de los espermatozoides, diluyendo los solutos a las concentraciones iniciales (Amann y Pickett, 1987). Si la descongelación es rápida y el hielo se disuelve rápidamente, diluye los solutos extracelulares. El agua entra rápidamente a los espermatozoides, que continúan con una alta concentración de solutos, lesionándolos (Graham, 1996).

El semen congelado rápidamente debe ser descongelado de la misma forma. En este caso, como los espermatozoides congelados rápidamente no son deshidratados cuando el hielo intracelular se derrite, la concentración intracelular de solutos es semejante a la extracelular y no hay pasaje rápido de agua a través de la membrana. Con la elevación rápida de la temperatura, tampoco ocurre recristalización del hielo intracelular cuando éste se descongela (Amann y Picket, 1987).

Después de la descongelación, el glicerol debe ser extraído de los espermatozoides en un medio que no contenga glicerol o a través de la inseminación, donde la dilución ocurre con las secreciones del tracto reproductivo de la yegua (Graham, 1996).

Los espermatozoides equinos, como los humanos, pueden producir especies reactivas del oxígeno (*reactive oxygen species*, ROS), las cuales en bajas concentraciones desempeñan un rol fisiológico en los fenómenos asociados a la capacitación, la reacción acrosómica, la hiperactivación y la fusión del espermatozoide con el ovocito. Por el contrario, la excesiva producción provocada por espermatozoides dañados durante la espermiogénesis, contaminación con leucocitos o algunos tratamientos biotecnológicos del semen, afecta negativamente la viabilidad de los espermatozoides. La cascada de peroxidación lipídica se inicia cuando las especies reactivas del oxígeno oxidan los ácidos grasos poli-insaturados (*polyunsaturated fatty acids*, PUFA), ubicados en la membrana plasmática (Baumber *et al* 2003).

Los espermatozoides son bastante resistentes al estrés oxidativo y, en consecuencia, son necesarias elevadas concentraciones de oxidantes para inducir alteraciones de la membrana plasmática. Sin embargo, la congelación/descongelación está asociada a la producción de especies reactivas del oxígeno. Como consecuencia de la peroxidación lipídica, la membrana pierde la integridad y fluidez necesarias para la fusión con el ovocito. Otro efecto adicional es el daño de ADN, los radicales libres y la criopreservación inducen la fragmentación del ADN en los espermatozoides y

parece ser que el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y no el superóxido (O₂⁻) es la especie responsable por la fragmentación de ADN (Baumber *et al* 2002).

La congelación/descongelación disminuye la resistencia de los espermatozoides al estrés oxidativo. Los espermatozoides equinos, sometidos a la congelación y posterior descongelación presentaron peroxidación de los lípidos de la membrana en niveles más bajos de estrés oxidativo y alcanzaron el mayor nivel de peroxidación que el semen no criopreservado (Neild *et al* 2002). La peroxidación de los lípidos ocurre principalmente en la pieza intermedia de los espermatozoides equinos. La peroxidación parece aumentar durante el almacenamiento de semen (Ball *et al* 2002).

La producción de altas concentraciones de radicales libres afecta negativamente la motilidad, la cual disminuye antes que se detecten alteraciones de la integridad de la membrana y la función mitocondrial (Ball *et al* 2002; Peris *et al* 2007). Para compensar la producción prematura de radicales libres hay intensa actividad de los antioxidantes (carroñeros enzimáticos) del plasma seminal en el semen. La dilución del plasma seminal, sin embargo, disminuye la resistencia espermática al estrés oxidativo (Ball *et al* 2002).

La adición de carroñeros (*scavengers*) enzimáticos como de antioxidantes hidro- o liposolubles no mejoró, hasta el momento, la motilidad durante la refrigeración a 5°C (Ball *et al* 2001; Ball *et al* 2002) o la criopreservación (Baumber *et al* 2005). Tampoco mostró efectos positivos sobre la motilidad, fragmentación del ADN, integridad del acrosoma, viabilidad o el potencial de membrana de las mitocondrias, después de la criopreservación (Ball *et al* 2004; Baumber *et al* 2005).

La morfometría (volumen, área y perímetro) de la cabeza de los espermatozoies, del semen congelado/descongelado, es menor que la del semen fresco. Esto es atribuido a las lesiones del acrosoma o alteración de la condensación de la cromatina, relacionadas con la criopreservación (Arruda *et al* 2002). Las alteraciones sufridas por las células espermáticas, como consecuencia de la congelación/descongelación, aumentan la producción de

radicales libres de oxígeno, que a su vez pueden aumentar la capacitación espermática y contribuyen con el daño oxidativo de los espermatozoides durante la criopreservación (Ball *et al* 2004).

9.3.2 DILUYENTES PARA SEMEN CONGELADO

Para criopreservar semen equino está disponible una variedad de protocolos, sin embargo no hay estudios comparativos controlados que indiquen cuál es el más eficiente. Actualmente, es común el uso de 2 diluyentes en la congelación de semen equino, uno para la dilución inicial y la centrifugación y otro para la congelación. Inicialmente, después de la recolección del semen con vagina artificial, éste debió ser centrifugado para remover el plasma seminal y concentrar los espermatozoides (Arruda *et al* 2002).

Aumentar la concentración de espermatozoides es necesario para que se pueda resuspender una dosis inseminante en un pequeño volumen de diluyente para la congelación. Los diluyentes usados para la centrifugación están descritos en la tabla 7.

Tabla 7. Diluyentes utilizados para centrifugación de semen

Diluyente	Componentes	Cantidades
Glucosa-EDTA (Martín y col., 1997)	Glucosa	6.0 g
	EDTA	0.370 g
	Citrato de sodio (dihidratado)	0.370 g
	Bicarbonato de sodio	0.120 g
	Estreptomina	0.050 g
	Penicilina	50 U
	Agua destilada	100 ml
<i>Citrato-EDTA</i> (Cochran y col., 1984)	Gucosa	1.5 g
	Citrato de sodio dihidratado	25.95 g
	EDTA	3.699 g
	Bicarbonato de sodio	1.2 g
	Polimixina B (sulfato)	c.s.p 1000 ml

Para la criopreservación, también pueden ser usados los diluyentes a base de leche descremada en polvo e INRA 82 (Tabla 3). En el momento de la adición, el diluyente debe estar a la misma temperatura que el semen y debe ser mantenida una relación mínima de 1:1. Después de la centrifugación, el sobrenadante debe ser aspirado y descartado. El paquete de semen deberá

ser resuspendido en el diluyente de congelación. Con espermatozoides refrigerados a 4°C durante 18 horas antes de ser criopreservados, se obtuvieron índices de preñez similares comparados con espermatozoides recolectados y congelados inmediatamente. Ello significa, que es posible llevar a cabo la recolección del semen en el Establecimiento donde se aloja el semental, realizar la inmediata centrifugación y dilución sin glicerol. Posteriormente, el transporte a un laboratorio central, para llevar a cabo la dilución con la solución de glicerol 4%, la congelación y distribución (Backman *et al* 2004).

Los diluyentes para la congelación contienen comúnmente yema de huevo, leche, detergente, tampones, electrolitos, antibióticos y glicerol. En la tabla 8 se describe la composición de los diluyentes lactosa-EDTA-yema de huevo, ampliamente utilizado por diversos autores. Cochran y col. (1984) usaron 0,5 ml de Equex STM® en vez de Orvus-ES® en el diluyente de lactosa-EDTA-yema de huevo. Tanto Equex STM como Orvus-ES® son compuestos que contienen sodio dodecyl (lauryl) sulfato (SDS) y son incluidos en los diluyentes de diversas especies. SDS es un detergente aniónico hidrosoluble y agente humectante, usado para solubilizar proteínas (Rota *et al* 1997).

Probablemente modifica la yema de huevo del diluyente, solubilizando sus moléculas activas. La adición de 0,5% de Equex STM® aumenta la proporción de espermatozoides intactos, inmediatamente después de la descongelación. Aumenta también la longevidad de los espermatozoides descongelados, prolongando la mantención de la motilidad e integridad de la membrana plasmática (Rota *et al* 1997).

El semen diluido con lactosa-EDTA-yema de huevo no necesita ser refrigerado a 5°C antes de la congelación. De esta forma, puede ser envasado a temperatura ambiente. Otro diluyente usado en la congelación de semen equino es el INRA 82 + 2% yema de huevo + 2,5% glicerol (Palmer, 1984). Vidament *et al* (1999) emplearon este diluyente, refrigeraron el semen a 4°C durante 75 min antes de envasarlo en pajillas de 0,5ml y lo congelaron.

Tabla 8. Composición de diluyente para congelamiento de semen equino

DILUYENTE	COMPONENTES	CANTIDADES (ml)
<i>Lactosa-EDTA-yema de huevo</i> (Martín y col., 1979)	Lactosa (11 % w/v)	50
	Diluyente EDTA	25
	Yema de huevo	20
	Orvus-Es ®	0.8
	Glicerol	5

9.3.3 DILUCIÓN Y DOSIS INSEMINANTE PARA SEMEN CONGELADO

La dilución del semen al ser congelado sigue los mismos criterios utilizados para el semen refrigerado. Para la IA esta indicada una dosis de 250×10^6 espermatozoides móviles. Esto, dependiendo de la concentración usada y el tamaño de la pajilla, puede requerir la congelación de más de una pajilla para completar la dosis inseminante. (Squires y Pickett, 1995).

Cristanelli *et al* (1984) congelaron semen usando una concentración de 700×10^6 espermatozoides con motilidad progresiva/ml de diluyente en pajillas de 0.5ml y obtuvieron 46% de preñez/ciclo. Graham (1996) verificó que la motilidad después de la descongelación disminuyó cuando la concentración espermática fue superior a 400×10^6 /ml. Lepold *et al* (1998) observaron una tendencia de mayor tasa de preñez al envasar concentraciones mayores de espermatozoides (1600×10^6 /ml) en pajillas de 0.5ml que con bajas concentraciones (400×10^6 /ml). Por eso los autores sugirieron el uso de una pajilla de 0.5 ml con una dosis única de 800×10^6 espermatozoides. Es posible que esto sea viable para el semen de algunos sementales y que tal vez dependa también del diluyente empleado (Lepold *et al* 1998).

Martin *et al* (1979) congelaron semen en macrotubos (4ml) con una concentración de 100×10^6 espermatozoides/ml. Después de la congelación, 50% de los espermatozoides presentaron motilidad, lo que significó que la dosis inseminante consistió en 200×10^6 aproximadamente. La tasa de preñez/ciclo fue de 63%. Vidament *et al* (1999) emplearon también una concentración de 100×10^6 espermatozoides y dosis superiores de 400×10^6 .

9.3.4 ENVASE DE SEMEN CONGELADO

A pesar de haber sido descrita la congelación de semen equino en macrotubos y pajillas, actualmente el semen es envasado generalmente en pajillas con capacidad variable entre 0.25 y 5.0 ml. También se emplean macrotubos o tubos de aluminio con capacidad de 5 a 25 ml. Las pajillas más utilizadas son las de 0.5 ml. La ventaja del uso de este tipo de envase es que su volumen facilita el almacenamiento. El procedimiento de llenado de la pajilla para la congelación incluye una burbuja de aire en el centro de la pajilla (Palma 2008).

9.3.5 CONGELACION DEL SEMEN

El semen envasado en pajillas puede ser congelado en el vapor de nitrógeno líquido o en una congeladora programable. Posteriormente las pajillas con semen deben sumergirse en nitrógeno líquido y transferidas a contenedores de almacenamiento. Para la congelación con vapor de nitrógeno, las pajillas deberán estar dispuestas horizontalmente en un soporte de malla metálica 1 a 4 cm por encima de la interfase líquido gas. La distancia del nitrógeno líquido y el tiempo de permanencia en el vapor determinan la velocidad de enfriado y la temperatura final. Semen congelado en pajillas de 0.5 ml debe ser mantenido 4 cm sobre el nitrógeno líquido durante 10 min antes de ser transferido al nitrógeno líquido (Cochran *et al* 1984).

Los macrotubos (de 4 ml) son mantenidos a 3 cm sobre el nitrógeno líquido durante 15 min (Martin *et al* 1979). La desventaja de este método es que el control de la curva de congelación no es muy preciso. A pesar de ello, Cochran *et al* (1984) no observaron diferencias en la motilidad después de la congelación/descongelación con este método y en una congeladora programable (Martin *et al* 1979).

Cochran *et al* (1984) y Cristanelli *et al* (1985) usaron una congeladora programable para semen envasado en pajillas de 0.5 ml con una curva de congelación de 10°C/min de 20°C a -15°C y de 25°C/min de -15°C a -120°C. Después que las pajillas alcanzaron -120°C, fueron colocadas en nitrógeno

líquido. Otra curva de congelación frecuentemente recomendada para los aparatos de congelación programables, es iniciando a 4°C y 10°C/min hasta -10°C, 20°C/min hasta -100°C y 60°C/min hasta -140°C y posterior colocación en nitrógeno líquido (Morel, 1999).

Al menos una pajilla de cada partida de semen congelado debe ser descongelada para evaluar su calidad. Como el porcentaje de espermatozoides móviles después de la descongelación está correlacionado con la fertilidad del semental (Wilhelm *et al* 1996), el semen, para ser usado en IA, debe tener una motilidad pos descongelación superior al 30% (Cristanelli *et al* 1984; Leipold *et al* 1998) o 35% (Klug *et al* 1977; Vidament *et al* 1999). Cuando la muestra descongelada no alcanza este valor, toda la partida de semen debe ser descartada.

9.3.6 DESCONGELACION DE SEMEN

La velocidad de descongelación puede estar afectada por diversos factores como temperatura, naturaleza del medio (aire o baño María), conductividad térmica del embase y especialmente el diámetro de éste (Morel, 1999).

El semen envasado generalmente es descongelado en un baño María. La temperatura del agua y el tiempo de inmersión deben ser informados por el responsable de la congelación. Pajillas de 0.5 ml de semen tradicionalmente eran descongeladas a 37°C durante 30 segundos. Mejor motilidad fue obtenida por Cochran *et al* (1984) al descongelar pajillas de 0.5 ml en baño María a 75°C durante 7 segundos, transfiriendo inmediatamente a otro baño a 37°C por más de 5 minutos. Es importante destacar que 1 segundo de más exposición en baño María a 75 °C eleva la temperatura de la pajillas a 40 °C, esto se refleja negativamente sobre el semen (Cochran *et al* 1984).

Algunos protocolos indican una dilución del contenido de la pajilla, después de la descongelación, en diluyente sin glicerol para obtener un volumen de 10 a 15 ml. Las pajillas de 4ml pueden ser descongeladas a 50°C durante 45 segundos (Martin *et al* 1979).

9.3.7 CONCEPCIÓN UTILIZANDO SEMEN CONGELADO

La tasa de preñez con semen congelado es mas baja que la obtenida con semen fresco o refrigerado. Se comprobó que la tasa de preñez con semen congelado fue de 86% de la correspondiente a la obtenida con semen fresco diluido. (Cristanelli *et al* 1984)

La tasa de preñez/ciclo varía de 0 a 70% con tasa media de 20% a 40% para una gran parte de los sementales (Brinsko y Varner, 1992). Para mejorar el porcentaje de preñez/ciclo con semen congelado/descongelado es necesaria la selección de los machos y fijar la IA próxima a la ovulación (Palmer, 1984).

La adaptación individual de los protocolos de congelación puede estar indicada según la variación de la congelabilidad entre machos para que el semen, de la mayor cantidad de sementales, pueda ser congelado (Brinsko y Varner, 1992).

Tabla 9. Índices de preñez descriptos por diversos autores

AUTORES	PRENEZ/CICLO (%)
<i>Klug y col. (1975)</i>	44
<i>Martín y col. (1979)</i>	63
<i>Cristanelli y col. (1984)</i>	56
<i>Love y col. (1989)</i>	50
<i>Vidament y col. (1999)</i>	49
<i>Loomis (2004)</i>	46

X INSEMINACION ARTIFICIAL

La primera mención de la utilización de la inseminación artificial equina (IAE) proviene de textos árabes del siglo XVI. (Perry, 1945, citado por Palma 2008). A fines del siglo XIX y principios del XX la IAE comenzó a ser empleada para la reproducción en masa de caballos, surgiendo el primer programa comercial de IAE en Rusia. En la década de 1930, la técnica ya estaba bien establecida. Hasta ese momento el caballo era utilizado principalmente en la guerra, el transporte y como fuerza motriz en la producción. La introducción de los motores de combustión en el transporte y la producción, resultó en la disminución de la población equina y simultáneamente en la reducción del interés de parte de los criadores y los recursos para la investigación. (Boyle, 1992).

A esto se le sumaron las restricciones y prohibiciones impuestas por las Asociaciones de criadores de la mayoría de las razas equinas, que se oponían a la utilización de la inseminación artificial. Ello condujo a un retraso en el desarrollo de la técnica. La IA continuó su aplicación pero en una población reducida. El nacimiento del primer potrillo, producto de la IA fue comunicado en 1957. (Barker y Gardie, 1957).

La inseminación artificial y el uso de semen congelado en equinos esta limitada a nivel mundial sobre todo en Inglaterra, sin embargo, en diversos países se han realizado estudios sobre el manejo del semen equino y la inseminación artificial con resultados favorables, Noruega y Alemania por ejemplo son países altamente interesados en la cruce y producción de equinos para actividades deportivas (Curry, 2000) y lo hacen por medio de inseminación y manejo de semen congelado, también en China existe una gran actividad con el uso de inseminación en equinos (Foote, 2002)

En los últimos años la producción equina se volcó para el empleo de los caballos en actividades de placer. Además, si bien algunas Asociaciones de criadores aún se oponen a la aplicación de la IAE, muchas la permitieron en los últimos años y algunas de ellas con restricciones.

La inseminación artificial, como en todas las especies presenta ventajas y desventajas. Entre las ventajas se incluyen el mejor aprovechamiento de los reproductores para servir un mayor número de yeguas, incluso a aquellas con alteraciones músculo-esqueléticas adquiridas, temperamento difícil o susceptible a endometritis, además de favorecer el control de las enfermedades venéreas. Otra ventaja es el aumento de la mejora genética en la crianza. Se reduce también el riesgo de accidentes del macho en el servicio natural, particularmente si en el momento de la extracción del semen se emplea un potro de monta o domy. La interrupción de las carreras o la participación en exposiciones no es necesaria. La IAE reduce las distancias, a través del transporte de semen enfriado o congelado dentro del país o bien internacional. Ello evita el transporte de la yegua con o sin potrillo al pie hasta el reproductor. Ello permite extender la temporada de servicio a otro hemisferio. Las recolecciones de semen para el servicio, permite la detección precoz de eventuales problemas. Por otra parte, los componentes de los diluyentes de semen ocasionalmente mejoran el potencial reproductivo de los reproductores subfértiles. (Morel, 1999)

Entre las desventajas atribuidas a la IAE se incluyen la reducción del pool de genes, la pérdida de ingresos referentes al trato de las yeguas, mayor oportunidad de fraudes, mayor riesgo para las personas que realizan la recolección de semen y la variación significativa de la calidad del semen disponible. Muchas de esas desventajas pueden ser eliminadas a través de medidas simples.

10.1 SELECCIÓN DE YEGUAS

Está indicado el examen ginecológico de las yeguas destinadas a la IA, con el fin de establecer su salud genital y cuando sea necesario tratarlas para mejorar las perspectivas de concepción y evitar la pérdida del semen (Palma 2008).

10.2 MOMENTO DE LA INSEMINACIÓN

La inseminación debe ser realizada durante el celo, lo más próximo a la ovulación. La duración del estro en la yegua varía entre 5 y 7 días, con la ovulación próxima al final del celo (24 a 48h antes del fin del celo). A pesar de

existir una variación en la duración del celo entre yeguas, existe una tendencia a la repetición del celo corto y largo en el mismo individuo (Palma 2008).

La inseminación puede ser realizada con celo natural o inducido con análogos de la prostaglandina (250 µg cloprostenol, 3 mg alfa-prostol, 0,25 µg fluprostol, 2 mg prostalene, 25 mg frenprostalene para yeguas con peso de 400 a 500 Kg; (Silva *et al* 1979; Bristol, 1987; Le Blanc,1995). Hasta el 5° día del ciclo, el cuerpo lúteo es refractario a la prostaglandina, pero presenta buena respuesta entre los días 6 y 9 (Loy *et al* 1979).

Después de la aplicación del análogo de PG, las yeguas presentan celo a los 2 a 3 días. En las yeguas que se encuentran en la fase de transición, después del anestro estacional, se pueden utilizar progestágenos como el altrenogest (allil-trembolona) en una dosis de 0,044 mg/Kg/día durante 10 a 14 días. Después de la interrupción del tratamiento, las yeguas presentan celo 2 a 3 días más tarde. La ovulación puede ser inducida por medio de la administración IM de 1500 a 3700 UI de HCG o de la aplicación de implantes de GnRH (deslorelin) cuando se encuentre un folículo con un tamaño igual o superior a 35 mm. En este caso la ovulación generalmente ocurre dentro de 48h después de la aplicación de hCG y 36 a 42 horas pos tratamiento con deslorelin (Samper, 2001).

Barbacini *et al* (2000) verificaron, en un estudio retrospectivo, que solo 9% de los ciclos no resultaron en ovulación y que el uso de HCG no resultó en pérdida de la fertilidad. De las yeguas tratadas con hCG ovulan 80,0% (McCue *et al* 2004) a 97,5% (Sieme *et al*,2003b) dentro de las 48 horas. El intervalo entre el tratamiento y la ovulación es más corto en la segunda mitad de la temporada de monta que en la primera (Sieme *et al* 2003b).

Cuando la IA con semen fresco es realizada después de la ovulación la tasa de recolección de embriones disminuye con el aumento del tiempo entre la ovulación y la inseminación. La calidad de los embriones permanece inalterada a pesar que el desarrollo parezca retardado (embriones menores y en estadias de desarrollo más temprano). Este retraso es atribuido al tiempo necesario para

la capacitación y, a medida que aumenta el tiempo entre la ovulación y la inseminación, al envejecimiento del ovocito (Huhtinen *et al* 1996).

El protocolo ideal de inseminación de yeguas es la inseminación artificial única en un período restringido, próximo a la ovulación, o sea, 12h antes a 12h después de la ovulación con semen congelado/descongelado y 24h antes a 12h después con el semen refrigerado. La repetición de la inseminación 24h después es recomendable, si la ovulación no ocurrió dentro del tiempo especificado después de la inseminación (Sieme y col., 2003b).

En los últimos años se adoptó un protocolo alternativo, semejante al de las yeguas inseminadas con semen refrigerado, con 2 inseminaciones estratégicas por ciclo. La ovulación es inducida con hCG o deslorelin, después de la detección de un folículo >35mm y la inseminación se realiza 24h a 40h después de la inducción. O sea, una vez antes y una vez después de la ovulación (Loomis y Squires, 2005).

El propósito de emplear este protocolo es ofrecer una forma simple y efectiva de manejo de yeguas para inseminar con semen congelado/descongelado. Las 2 inseminaciones estratégicas, una antes y otra después de la ovulación, resultaron en un índice de concepción comparable al de yeguas inseminadas una vez después de la inseminación y permite al médico veterinario examinar las yeguas solo una vez al día, sin comprometer la fertilidad y evitando el mayor costo de 3 a 4 exámenes (1 cada 6 a 8 horas), (Squires *et al* 2003; Loomis, 2004; Loomis y Squires, 2005).

10.3 TÉCNICAS

10.3.1 INSEMINACIÓN ARTIFICIAL CON CONTROL MANUAL

Este método es utilizado con mayor frecuencia. La mano del operador aislada por un guante estéril, asegura, protege y conduce la pipeta de inseminación. Después de la lubricación de la mano y el brazo con solución de NaCl 0,9%, y después de la separación de los labios de la vulva, serán introducidos a través del vestíbulo, hacia el interior de la vagina. En la extremidad craneal de la vagina se localiza la abertura del cervix y se introduce

al dedo índice. La pipeta de inseminación es dirigida sobre el dedo hacia el interior del útero (Palma 2008).

10.3.2 INSEMINACIÓN BAJO CONTROL VISUAL

La IA se lleva a cabo con ayuda de un espejo de Polanksy (Figura 3 a) y la pinza de Albrechtsen previamente esterilizados por medio de la llama. Después de la colocación del espejo, la pipeta de inseminación, fijada en la pinza de Albrechtsen es introducida en la vagina. La extremidad craneal de la vagina la pinza se abre, soltando la pipeta. Con la pinza se fija un pliegue de la porción ventral del cervix y éste es traccionado en sentido caudal, estirando el cérvix y permitiendo así la introducción de la pipeta bajo control visual. También se puede realizar con la ayuda de un endoscopio, pero esta técnica hace más elevado el costo inicial, debido al precio del aparato. (Klug, 1993).

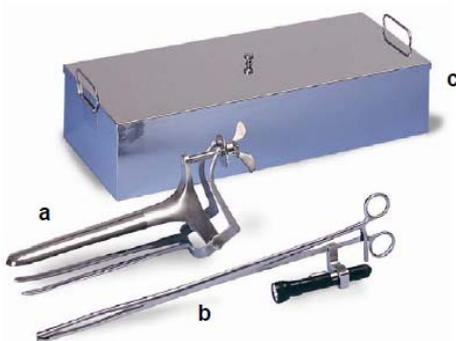


Fig. 3: a) Espéculo de Polansky b) Forcep cervical con linterna c) Caja metálica (Minitüb, Alemania).

Con la pipeta colocada adecuadamente, el semen es depositado en el interior del útero, con ayuda de una jeringa. Es importante que toda la dosis sea depositada en el útero. Para esto la jeringa deberá ser desconectada de la pipeta, se deberá aspirar un poco de aire e inyectarlo al interior del útero.

Independientemente del método utilizado, el semen es depositado en el cuerpo del útero o preferentemente en el cuerno del útero ipsilateral al ovario que tiene el folículo preovulatorio, porque un porcentaje mayor de espermatozoides fue recuperado del oviducto de yeguas inseminadas en la punta del cuerno ipsilateral del ovario con folículo dominante (77,3%) que en aquellas inseminadas en el cuerpo del útero (53,8%) (Rigby, 2000 *et al* 2000).

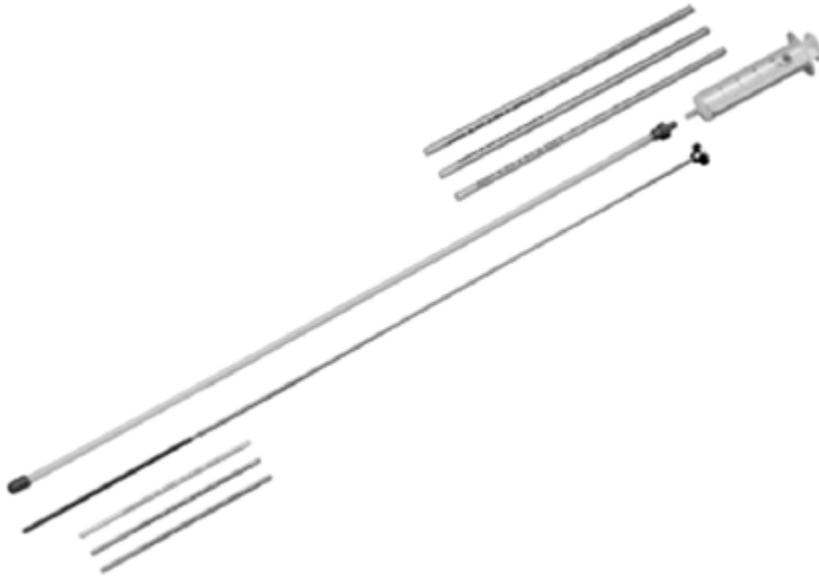


Fig. 4: Pipeta universal de inseminación (Minitüb, Alemania)



Fig. 5: Dispositivo de inseminación intrauterina profunda (Minitüb, Alemania)

Según Squires y col. (2003) la inseminación uterina profunda, por medio del control rectal, no ofrece un índice de preñez mejor que el de yeguas inseminadas en el cuerpo del útero. Sieme y col. (2004) observaron que en yeguas problema, la inseminación artificial convencional en el cuerpo del útero es superior a la inseminación histeroscópica y que en yeguas sanas la tasa de preñez más elevada puede ser alcanzada con la inseminación histeroscópica. En yeguas problema la inseminación con semen congelado resulta en una preñez más baja que con semen fresco. La inseminación histeroscópica con semen congelado/descongelado sobre la papila útero-tubárica resultó en una tasa de recuperación de embriones de 58,6% y es una alternativa viable para la aplicación comercial de semen equino congelado (Alvarenga y col., 2004b).

XI CONCLUSIONES

Para realizar un adecuado manejo reproductivo del semental equino en la actualidad, es necesario tener claro conocimiento de las prácticas biotecnológicas actuales aplicadas a esta especie, que maximizan la eficiencia reproductiva de estos.

Para conseguir el éxito en lo anterior, es necesario contar con algunos conceptos básicos y tener claro varios factores, todos ellos citados y explicados en el presente trabajo.

XII) LITERATURA CITADA

- Althouse GC, SM Hopkins (1995) Assessment of boar sperm viability using a combination of two fluorophores *Theriogenology* 43, 595-603
- Alvarenga MA, Leão KM, Papa FO, Ladim-Alvarenga FC, Medeiros ASL, GM Gomes (2004a) The use of alternative cryoprotectors for freezing stallion semen In: Havemeyer Foundation Monograph Series No 12 – Transporting Gametes and Embryos, 74-76
- Alvarez JG, BT Storey (1984) Assessment of cell damage caused by spontaneous lipid peroxidation in rabbit spermatozoa *Bio Repr* 30, 323-331
- Amann RP, BW Pickett (1987) Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa *J Eq Vet Sci* 7, 145-173
- Amann RP, JK Graham (1993) Spermatozoal function In: Equine Reproduction AO McKinnon and JL Voss (eds), Lea & Febiger, Philadelphia, 715-745
- Amann RP, Loomis PR, BW Pickett (1983) Improves filter system for an equine artificial vagina *Eq Vet Sci* 3, 120-125
- Arruda RP, Ball BA, Gravance CG, Garcia AR, Liu IKM (2002) Effects of extenders and cryoprotectants on stallion sperm head morphometry *Theriogenology* 58, 253-256
- Aurich C (2005) Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion Spermatozoa *Anim Reprod Sci* 89, 65-75
- Backman T, Bruemmer JE, Graham JK, EL Squires (2004) Pregnancy rates of mares inseminated with semen cooled for 18 hours and than frozen *J Anim Sci* 82, 690-694
- Ball BA, Baumber J, Burnaugh L, Sabeur K, AS Meyers (2004) Effects of oxidative stress on equine spermatozoa during cryopreservation In: Havemeyer Foundation Monograph Series No12 –Transporting Gametes and Embryos, 87-89
- Ball BA, Baumber J, K Sabeur (2002) Role of reactive oxygen species on normal and abnormal function of equine spermatozoa *Theriogenology* 58, 299-300
- Ball BA, Gravance CG, Wessel MT, K Sabeur (2003) Activity of angiotensin-converting enzyme (ACE) in reproductive tissues of the stallion and effect of angiotensin II on sperm motility
- Ball BA, Medina V, Gravance CG, J Baumber (2001) Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5°C *Theriogenology* 56, 577-589
- Baranska K, M Tischner (1995) Evaluating capacitation of stallion spermatozoa obtained from the mare's reproductive tract *Biol Reprod, Monograph Equine Reproduction*, VI, 707-712
- Barker CAV, JCC Gandier (1957) Pregnancy in a mare resulting from frozen epididymal spermatozoa. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 2, 47- 51

- Batellier F, Duchamp G, Vidament M, Arnaud G, Palmer E, M Magistrini (1998) Delayed insemination is successful with a new extender for storing fresh equine semen at 15°C under aerobic conditions *Theriogenology* 50, 229-236
- Baumber J, Ball BA, Linfor JJ, AS Meyers (2002) Reactive oxygen species and cryopreservation promote deoxyribonucleic acid (DNA) damage in equine sperm *Theriogenology* 58, 301-302
- Baumber J, Sabeur K, Vo A, Ball BA (2003) Reactive oxygen species promote tyrosine phosphorylation and capacitation in equine spermatozoa *Theriogenology* 60, 1239-1247
- Bedford SJ, Jasko DJ, Graham JK, Amann RP, Squires EL, BW Pickett (1995) Effect of seminal extenders containing egg yolk and glycerol on motion characteristics and fertility of stallion spermatozoa *Theriogenology* 43, 955-967
- Boyle MS (1992) Artificial insemination in the horse *Annales de Zootechnie*, 41, 311-318
- Braun J, Sakai M, Hochi S, N Oguri (1994) Preservation of ejaculated and epididymal stallion spermatozoa by cooling and freezing *Theriogenology* 41, 809-818
- Brinsko SP, Blanchard TL, Rigby SL, Love CC, DD Varner (2003) Effects of dead spermatozoa on motion characteristics and membrane integrity of live spermatozoa in fresh and cooled-stored equine semen *Theriogenology* 59, 735-742
- Brinsko SP, Crockett EC, EL Squires (2000a) Effect of centrifugation and partial seminal plasma removal on equine spermatozoal motility after cooling and storage *Theriogenology* 54, 129-136
- Brinsko SP, DD Varner (1992) Artificial insemination and preservation of semen *Vet Clin North Am Equine Pract* 8, 205-218
- Brinsko SP, Rowan KR, Varner DD, TL Blanchard (2000b) Effects of transport container and ambient storage temperature on motion characteristics of equine spermatozoa *Theriogenology* 53, 1641-1655
- Broussard JR, Roussel JD, Hibbard M, Thibodeaux JK, Goodeaux SD, LL Goodeaux (1990) The effects of monoject and air-tite syringes on equine spermatozoa *Theriogenology* 33, 200
- Chenier T, Merckies K, Leibo S, Plante C, W Johnson (1998) Evaluation of cryoprotective agents for use in the cryopreservation of equine spermatozoa *En: 44th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners Baltimore, USA* 5-6
- Cochran JD, Aman RP, Froman DP, BW Pickett (1984) Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5°C, freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm *Theriogenology* 22, 25-38
- Colenbrander B, Brouwers JFHM, Neild DM, Stout TAE, da Silva P, BM Gadella (2002) Capacitation dependent rearrangements in the plasma membrane of equine sperm *Theriogenology* 58, 341-345
- Cristanelli MJ, Squires EL, Amann RP, BW Pickett (1984) Fertility of stallion semen processed, frozen and thawed by a new procedure *Theriogenology* 22, 39-45

Curry. M. Cryopreservation of semen from domestic livestock, *Journals of Reproduction and Fertility*. 2000; 1359-6004

Douglas-Hamilton DH, Osol R, Osol G, Driscoll D, H Noble (1984) A field study of the fertility of transported equine semen *Theriogenology* 22, 291-304

Fazeli AR, Steenweg W, Brevers MM, Van Den Broek J, Bracher V, Parlevliet J, B Colenbrander (1995) Relationship between stallion sperm binding to homologous hemizona and fertility *Theriogenology* 44, 751-760

Foot R. H. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *J Anim Sci* 2002. 80:1-10.

Frazer GS, DM Bucci (1996) Characterization of the major polypeptides of equine seminal plasma by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis *Theriogenology* 46, 1389-1402

Gadella BM and B Colebrander (2004) Bicarbonate dependent capacitation of mammalian sperm cells: a comparative overview In: Havemeyer Foundation Monograph Series No 12 – Transporting Gametes and Embryos, 43-49

Gahne S, Ganheim A, L Malmgren (1998) Effect of insemination dose on pregnancy rate in mares *Theriogenology* 49, 1071-74

Galina, C. (2008). *Reproducción de Animales Domésticos 3ª Edición*. Limusa. México. pp. 43-57.

Gamboa S, J Ramalho-Santos (2005) SNARE proteins and caveolin-1 in stallion spermatozoa: possible implications for fertility *Theriogenology* 64, 275-291

Garner DL, Pinkel D, Johnson LA, MM Pace (1986) Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses *Biol Reprod* 34, 127-138

Gomes GM, Jacob JCF, Medeiros ASL, Papa FO, MA Alvarenga (2002) Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the Mangalarga Marchador breed *Theriogenology* 58, 277-279

Graham JK (1996) Cryopreservation of stallion spermatozoa *Vet Clin North Am Eq Pract* 12, 131-147

Graham JK (2001a) Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach *Anim Reprod Sci* 68, 239-247

Graham JK (2001b) Assessment of sperm quality In: 47th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, San Diego, USA, 302-305

Hammerstedt RH, Graham JK, JP Nolan (1990) Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive *J Androl* 11, 73-88

Hillmann RB, Olar TT, Squires EL, BW Pickett (1980) Temperature of the artificial vagina and its effect on seminal quality and behavioral characteristics of stallions *JAVMA* 177, 720-22

Householder DD, Pickett BW, Voss JL, TT Olar (1981) Effect of extender, number of spermatozoa and HCG on equine fertility *J Equine Vet Sci* 1, 9-13

- Ijaz A, R Ducharme (1995) Effect of various extenders and taurine on survival of stallion sperm cooled to 5°C Theriogenology 44, 1039-1050
- Jasko DJ (1992) Evaluation of stallion semen Vet Clin North Am Equine Pract 8, 129-148
- Jeyendran RS, Van Der Vem HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJD 1984 Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics J Reprod Fert 70, 219-228
- Katila T (1997a) Procedures for handling fresh stallion semen Theriogenology 48, 1217-1227
- Katila T (1997b) Interactions of the uterus and semen Pferdeheilkunde 13, 508-511
- Katila T (2001) Sperm-uterine interactions: a review An Reprod Scie 68, 267-272
- Kayser JP, Amann RP, Shideler RK, Squires EL, Jasko DJ, BW Pickett (1992) Effects of linear cooling rates on motion characteristics of stallion spermatozoa Theriogenology 38, 601-14
- Kenney RM, Bergman RV, Cooper WL, GW Morse (1975) Minimal contamination techniques for breeding mares: technique and preliminary findings In: 21st Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners USA 327-336
- Killian GJ (2004) Evidence for the role of oviduct secretions in sperm function, fertilization and embryo development An Reprod Scie 82-83, 141-153
- King SS, Speiser AS, Jones KL, Apgar GA, SE Wessels (2006) Equine spermatozoal motility and fertility associated with the incorporation of D-(+)-mannose into semen extender Theriogenology 65, 1171-1179
- Klug E (1993) Frischsamenübertragung beim Pferd: ein Grundkurs 4 Verlag M & H Shaper, Alfeld-Hannover 128p
- Krause D (1966) Untersuchungen am Bullensperma unter Berücksichtigung der fertilitätsdiagnostischen Bedeutung der Befunde Habilitationsschrift zur Erlangung der *venia legendi* Tierärztliche Hochschule Hannover 165p
- Leipold SD, Graham JK, Squires EL, Mccue PM, Brinsko SP, DK Vanderwall (1998) Effect of spermatozoal concentration and number on fertility of frozen equine semen Theriogenology 49, 1537-1543
- Linfor JJ, Pommer AC, AS Meyers (2002) Osmotic stress induces tyrosine phosphorylation of equine sperm Theriogenology 58, 355-358
- Loomis PR (2001a) The equine frozen semen industry An Reprod Scie 68, 191-200
- Loomis PR, EL Squires (2005) Frozen semen management in equine breeding programs Theriogenology 64, 480-491
- Love CC (1992) Semen collection techniques Vet Clin North Am Equine Pract 8, 111-128

Love CC, Thompson JA, Lowry VK, DD Varner (2001) The relationship between chromatin quality and fertility of chilled stallion sperm In: 47th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners San Diego, USA, 229-231

Love CC, Thompson JA, Lowry VK, DD Varner (2002) Effect of storage time and temperature on stallion sperm DNA and fertility Theriogenology 57, 1135-1142

Malmgren L (1997) Assessing the quality of raw semen Theriogenology 48, 523-530

Malmgren L (1998) Effectiveness of two systems for transporting equine semen Theriogenology 50, 833-839

Mann T (1964) Metabolism of semen: fructolysis, respiration and sperm energetics In: The biochemistry of semen and of the male reproductive tract T Mann (ed), Barnes & Noble, NY, 265-307

Mann T (1975) Biochemistry of stallion semen J Reprod Fert 23, 47-52

Martin JC, Klug E, AR Günzel (1979) Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws J Reprod Fert 27, 47-51

Mattos R, Castilho LFF, Keller A, Malschitzky E, Neves AP, Hött AK, Silva JFS, Garbade P, Gregory RM, RC Mattos (1997) Influência da agitação e do vácuo na motilidade e fertilidade de sêmen eqüino diluído e preservado a +4oC Arq Fac Vet UFRGS 25, 44-53

Mattos RC, Cavalheiro EP, Mies Filho A, RM Gregory (1990) Cerovsky – método alternativo para avaliação morfológica de espermatozoides eqüinos Rev Bras Reprod Anim 14, 243-247

Mattos RC, EP Cavalheiro (1988) Monta natural e inseminação artificial com sêmen fresco em aguas cruza árabe En: X Congresso Estadual de Medicina Veterinária Porto Alegre Brasil p 46

McDonnell SM, CC Love (1991) Xylazine-induced ex copula ejaculation in stallions Theriogenology, 36, 73-76

Medeiros ASL, Gomes GM, Carmo MT, Papa FO, MA Alvarenga (2002) Cryopreservation of stallion sperm using different amides Theriogenology 58, 273-276

Meirelles LS, Lagares MA, Brito ELR, Silveira GB, Conceição TR, Bahniuk MC, Moraes IA, Pabst CU, Gregory RM, Garbade P, RC Mattos (1999) Efeito de diluentes à base de leite desnatado de diversas osmolalidades na preservação de sêmen eqüino resfriado Arq Fac Vet UFRGS 27, 53-59

Meirelles LS, Malschitsky E, Neves AP, Vieira MJ, Keller A, Hött AK, Moraes IMA, Garbade P, Gregory RM, RC Mattos (1998) Leite em pó desnatado não inativado e leite desnatado UHT para preservação e fertilidade do sêmen eqüino resfriado Ciência Rural 28, 467-70

Metcalf ES (1998) Pregnancy rates with cooled equine semen received in private praxis In: 44th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners Baltimore USA 5-6

Moore AI, Squires EL, Graham JK (2005) Effect of seminal plasma on the criopreservation of equine spermatozoa Theriogenology 63, 2372-2381

Moran DM, Jasko DJ, Squires EL, RP Amann (1992) Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa *Theriogenology* 38, 999-1012

Morel MCD (1999) *Equine artificial insemination* CABI Publishing New York 406p

Neild DM, Gadella BM, Chaves MG, Miragaya MH, Colenbrander B, A Agüero (2003) Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation *Theriogenology* 59, 1693-1705

Neild DM, Gadella BM, Colenbrander B, Agüero A, JFHM Brouwers (2002) Lipid peroxidation in stallion spermatozoa *Theriogenology* 58, 295-298

Nie GJ, Wenzel JGW (2001) Adaptation of the hypoosmotic swelling test to assess functional integrity of stallion spermatozoal plasma membranes *Theriogenology* 55, 1005-1018

Nishikawa Y (1975) Studies on the preservation of raw and frozen horse semen *J Reprod Fert* 23, 99-104

NORMA Oficial Mexicana NOM-027-ZOO-1995, Proceso zosanitario del semen de animales domésticos.

Palma G (2008) *Biología de la reproducción. Inseminación artificial en la especie equina*. Karin Brass y Gustavo Palma 525-575.

Palmer E (1984) Factors affecting stallion semen survival and fertility In: *Proc 10th Int Congress on Anim Reprod and AI Urbana-Champaign, IL USA* 3, 377

Parinaud J, Le Lannou, D, Vieitez G, Griveau, J-F, Milhet P, G Richoilley (1997) Enhancement of motility by treating spermatozoa with an antioxidant solution (Sperm-Fit©) following ejaculation *Hum Reprod* 12, 2434-2436

Peris SI, Bilodeau JF, Dufour M, JL Bailey (2007) Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm *Mol Reprod Dev* 2007 (in press)

Pickett BW (1993) Seminal extenders and cooled semen In: *Equine Reproduction* AO McKinnon and JL Voss (eds) Lea & Febiger Philadelphia, 746-754

Pickett BW, Faulkner LC, JL Voss (1975) Effect of season on some characteristics of stallion semen *J Reprod Fert* 23, 25-28

Pickett BW, RP Amann (1993) Cryopreservation of semen In: *Equine Reproduction* AO McKinnon and JL Voss (eds) Lea & Febiger Philadelphia, 769-789

Pommer AC, AS Meyers (2002) Tyrosine phosphorylation is an indicator of capacitation status in fresh and cryopreserved stallion spermatozoa *Theriogenology* 58, 351-354

Pommer AC, Rutlant J, SA Meyers (2002) The role of osmotic resistance on equine spermatozoal function *Theriogenology* 58, 1373-1384

Province CA, Squires EL, Pickett BW, RP Amann (1985) Cooling rates, storage temperatures and fertility of extended equine spermatozoa *Theriogenology* 23, 925-934

- Pruitt JA, Arns MJ, KC Pool (1993) Seminal plasma influences recovery of equine spermatozoa following in vitro culture (37°C) and cold storage (5°C) *Theriogenology* 39, 291
- Rathi R, Colenbrander B, Stout TA, Bevers MM and BM Gadella (2003) Progesterone induces acrosome reaction in stallion spermatozoa via a protein tyrosine kinase dependent pathway *Mol Reprod Dev* 64, 120-128
- Rathi R, Colenbrander B, Stout TAE, Bevers MM, BM Gadella (2002) Progesterone induces the acrosome reaction in stallion spermatozoa via a protein tyrosine kinase-dependent pathway *Theriogenology* 58, 307-311
- Rigby SL, Brinsko SP, Cochran M, Blanchard TL, Love CC, Varner DD (2001a) Advances in cooled semen technologies: seminal plasma and semen extender *Animal Reproduction Science* 68, 171-180
- Rota A, Strom B, Linde-Forsberg C, H Rodriguez-Martinez (1997) Effects of Equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C *Theriogenology* 47, 1093-1101
- Silva Filho JM, Santiago MLD, Palhares MS, Melo MA, LGP Magnago (1994) Fertilidade de aguas inseminadas com sêmen "in natura" ou diluído no diluidor de mínima contaminação *Rev Bras Repr Anim* 18, 69-80
- Squires EL, BW Pickett (1995) Pregnancy rates with cryopreserved semen In: *Techniques for handling and utilization of transported cooled and frozen equine spermatozoa Colorado USA* 106
- Squires EL, Crockett EC, Graham JK, JE Bruemmer (1999) Effect of centrifugation and cooling prior to freezing on post-thaw motility of equine spermatozoa In: *45th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners Albuquerque USA* 219-20
- Squires EL, Keith SL, JK Graham (2004) Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa *Theriogenology* 62, 1056-1065
- Troedsson MHT (2004) Role of seminal plasma in freezing equine spermatozoa In: *Havemeyer Foundation Monograph Series No 12 – Transporting Gametes and Embryos*, 90-91
- Troedsson MHT, Loset K, Alghamdi AM, Dahms B, BG Crabo (2001) Interaction between equine semen and the endometrium: inflammatory response to semen *Animal Reproduction Science* 68,273- 278
- Turner RMO, McDonnell SM, JF Hawkins (1995) Use of pharmacologically induced ejaculation to obtain semen from a stallion with a fractured radio *JAVMA* 206,1906-1908
- Varner DD, Blanchard TL, Meyers PJ, SA Meyers (1989) Fertilizing capacity of equine spermatozoa stored for 24 hours at 5 or 20°C *Theriogenology* 32, 515-525
- Varner EL, Blanchard TL, Love CL, Garcia MC, RM Kenney (1987) Effects of semen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoal motility parameters *Theriogenology* 28,709-723

- Varner EL, Blanchard TL, Love CL, Garcia MC, RM Kenney (1988) Effects of cooling rate and storage temperature on equine spermatozoal motility parameters *Theriogenology* 29,1043-1054
- Vidament M, Magistrini M, Palmer E, F Clément (1999) Equine artificial insemination in french national studs In: 3rd Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction Aug er, France, 61-66
- Volkman DH, D Van Zyl (1987) Fertility of stallion semen frozen in 0.5 ml straws *J Reprod Fert* 35,143-148
- Watson PF (1995) Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function *Reprod Fertil Dev* 7, 871-91
- Wessel MT, GC Althouse (2006) Validation of an objective approach for simultaneous assessment of viability and motility of fresh and cooled equine spermatozoa *Proceedings of the International Symposium on Equine Reproduction, Anim Reprod Scie* 94, 21-22
- Wessel MT, Gravance CG, Sabeur K, Ball BA (2002) effect of angiotensin II on the motility of fresh and frozen-thawed equine spermatozoa *Theriogenology* 58, 265-267
- Wilhelm KM, Graham JK, EL Squires (1996) Comparison of the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa with sperm motion analyses, flow cytometric evaluation, and zona-free hamster oocyte penetration *Theriogenology* 46, 559-578
- Wu JT, Chiang KC, Cheng FP (2006) Expression of progesterone receptor(s) during capacitation and incidence of acrosome reaction induced by progesterone and zona proteins in boar spermatozoa *Anim Reprod Sci* (1-2), 34-45
- Zarco, L., Boeta, M. (2000). *Reproducción Equina 3ª Edición*. Academia de investigación en biología de la reproducción equina, A.C. UNAM. México. pp. 132-137.