

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICO VETERINARIAS



Programas hormonales utilizados en la sincronización en yeguas para inseminación artificial o monta natural.

Por:

JUAN RAMÓN RAMÍREZ AVITIA

MONOGRAFIA

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Torreón, Coahuila, México
septiembre 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICO VETERINARIAS

Programas hormonales utilizados en la sincronización en yeguas para inseminación artificial o monta natural.

Por:

JUAN RAMÓN RAMÍREZ AVITIA

MONOGRAFIA

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

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Aprobada por:


Rodrigo Isidro Simón Alonso
Presidente


Jesús Alfonso Amaya González
Vocal


Martín Castillo Ramírez
Vocal


José Luis Francisco Sandoval Elías
Vocal Suplente

MC. J. GUADALUPE RODRÍGUEZ MARTÍNEZ
Coordinador de la División Regional de Ciencia Animal



Torreón, Coahuila, México
septiembre 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICO VETERINARIAS

Programas hormonales utilizados en la sincronización en yeguas para inseminación artificial o monta natural.

Por:

JUAN RAMÓN RAMÍREZ AVITIA

MONOGRAFIA

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Aprobada por el Comité de Asesoría:


Rodrigo Isidro Simón Alonso
Asesor Principal


MC. J. GUADALUPE RODRÍGUEZ MARTÍNEZ
Coordinador de la División Regional de Ciencia Animal



Torreón, Coahuila, México
septiembre 2019

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a;

Dios, por la familia y amigos que me dio la oportunidad de tener, por la salud y la vida que todos gozamos gracias a él, por los logros y los sueños que día a día me ha permitido superar, por todas las cosas materiales que me permite obtener.

A mis padres por la oportunidad, la confianza y el apoyo tanto económico y moral que me han brindado a lo largo de toda mi vida y en mi carrera profesional, por la estabilidad económica que me brindaron antes y después de mi carrera profesional aun ya siendo parte de otra familia.

A todos mis familiares y conocidos que día a día se preocuparon en estar al pendiente de mí después de haber emprendido mi viaje hacia la universidad, y que estuvieron al pendiente de mis padres y hermanos.

A mis compañeros y amigos de la universidad que siempre estuvieron para apoyarme en las buenas y en las no tan buenas, que estuvieron en esta etapa tan importante de nuestras vidas y que siempre serán parte de mi vida.

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo;

Primeramente a Dios quien me dio la vida y me ha acompañado en todo mi camino, a pesar que en ocasiones pensaba que ya no había salida, el siempre me acompañó y me ayudo a levantarme cada mañana, a superar esos momentos, estos años que he estado lejos de mi familia, él me ha dado la fortaleza para seguir adelante.

A mi padre que me ha brindado la fuerza y el apoyo que siempre es para mí, mi mejor amigo, mi ejemplo y mi profesor, que me enseñó todo lo bueno y lo malo de la vida, que me hizo un hombre de bien y me enseñó a trabajar a ser honesto y a seguir el camino del bien.

A mi madre que con su amor, cariño, consejos y abrazos me llevo a superar momentos muy dolorosos en mi carrera profesional siendo mi pilar más fuerte antes, durante y después de este reto, por tenerme la paciencia para escucharme y educarme de la mejor manera, y por mantener a toda nuestra familia unida.

A mis hermanos y mi sobrina, que siempre me han dado el aliento y los consejos para poder continuar adelante, que son mis amigos, mi paño de lágrimas y mis cómplices, y que siempre han estado con migo en buenos y malos momentos.

A mi hija que siempre ha sido mi motor y mi motivación para este y muchos logros más, que siempre me brinda y me contagia la felicidad que la caracteriza y que siempre está para darme su cariño, un abrazo y un beso cuando lo necesito.

A las personas que desgraciadamente ya no se encuentran entre nosotros y que están al lado de nuestro señor. Familia, compañeros y amigos que se han ido a lo largo de mi carrera pero que siempre llevé en mi mente y mi corazón **D.E.P.**

A las personas que estuvieron con migo en algunos momentos de mi vida y que ahorita ya no lo están, pero fueron piezas clave para el forjamiento de mis conocimientos y mi carácter.

A todos y cada unos de los profesores y catedráticos de mi universidad que han estado para apoyarme y brindarme todos sus conocimientos, ya sea en un aula o en cualquier otro lado, Siendo mi profesor de materia o siendo mi amigo.

A los profesores que me han brindado la asesoría adecuada para la culminación de este trabajo, a mí asesor principal y todos mis sinodales.

GRACIAS...

RESUMEN

La yegua es considerada una especie poliéstrica estacional que, en función de la latitud, presenta cambios en el ritmo circanual de la reproducción, de tal manera que exhibe actividad ovárica máxima durante primavera y verano ,15 a 16 horas de luz, y periodos de no actividad en los meses de invierno como respuesta a mayor liberación de melatonina (ML), la cual ejerce su acción sobre receptores específicos acoplados a una proteína G, en el sistema nervioso central, lo que inhibe la liberación de GnRH por parte del hipotálamo y tiene como consecuencia la disminución en la liberación de gonadotropinas. Esto genera el bloqueo de la dinámica folicular, ya que los niveles de FSH no son suficientes para que ocurra la segunda activación denominada activación de folículos terciarios o antrales. Esta activación, en el caso particular de las especies fotoperiódicas, ocurre solamente en la temporada de transición y en la reproductiva.

La regularidad del ciclo estral está determinada por el balance de las hormonas producidas por la glándula pineal, el hipotálamo, la hipófisis, los ovarios y el endometrio.

El control de la ovulación es un punto clave en el manejo reproductivo de la yegua. Por esta razón la inducción de la ovulación es una práctica frecuente dentro del manejo reproductivo en los diferentes criaderos del país, buscando reducir el número de inseminaciones, la duración del ciclo y el intervalo hasta la ovulación, lo que aumenta las tasas de fertilidad.

PALABRAS CLAVE: Equinos, Ciclo estral, Estro, Hormonas, Sincronización.

INDICE

AGRADECIMIENTOS.....	i
DEDICATORIAS.....	ii
RESUMEN.....	iii
REVISION DE LITERATURA.....	1
INTRODUCCION.....	1
APARATO DE LA YEGUA.....	2
OVARIOS.....	2
UTERO.....	3
VULVA.....	3
CICLO ESTRAL.....	4
DINAMICA FOLICULAR OVARICA.....	6
RECONOCIMIENTO MATERNO DE LA PREÑEZ.....	8
TRATAMIENTO PARA LA OVULACION.....	9
INSEMINACION ARTIFICIAL EQUINOS.....	10
INTRODUCCION.....	10
INSEMINACION ARTIFICIAL.....	12
EQUIPO UTILIZADO PARA LA RECOLECCION DEL SEMEN EQUINO.....	14
VAGINA ARTIFICIAL.....	14
SISTEMAS TRADICIONALES Y ALTERNATIVOS EN LA RECOLECCION DEL SEMEN EQUINO.....	19
PRESERVATIVO.....	23
MASTURBACION.....	24

EXCOPULA.....	25
EXTRACCION DE ESPERMATOZOIDES DE CONDUCTO EPEDIDIMARIO.....	29
TRANSPORTE DEL SEMEN EQUINO.....	30
CONSIDERACIONES SOBRE EL MANEJO DE LA YEGUA.....	33
SOLICITUS DEL ENVIO DE SEMEN.....	35
PROTOCOLO DEL MANEJO DEL SEMEN Y TECNICA DE INSEMINACION.....	36
VOLUMEN DE LA INSEMINACION.....	40
DIAGNOSTICO DE PREÑEZ.....	41
PRUEBA AL SEMEN PARA ENFRIAMIENTO Y ALMACENAMIENTO.....	41
PROCESAMIENTO SEMEN REFRIGERADO.....	42
BIBLIOGRAFIA.....	47

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

CUADROS

CUADRO 1.0.....	13
-----------------	----

FIGURAS

FIGURA 1.0.....	16
-----------------	----

FIGURA 1.1.....	16
-----------------	----

FIGURA 1.2	17
------------------	----

FIGURA 1.3, 1.4,	18
------------------------	----

FIGURA 1.4, 1.5,	20
------------------------	----

FIGURA 1.6.....	20
-----------------	----

FIGURA 1.7, 1.8.....	21
----------------------	----

FIGURA 1.9, 2.0.....	22
----------------------	----

FIGURA 2.1.....	23
-----------------	----

FIGURA 2.2.....	23
-----------------	----

FIGURA 2.3.....	24
-----------------	----

FIGURA 2.4.....	25
-----------------	----

FIGURA 2.5.....	26
-----------------	----

FIGURA 2.6.....	28
-----------------	----

FIGURA 2.7, 2.8.....	29
----------------------	----

FIGURA 2.9.....	30
-----------------	----

Revisión de literatura.

Introducción.

La yegua es un animal que tiene un periodo gestacional aproximado de 333-345 días, por lo tanto, para mantener la producción de un potro por año las mismas deben quedar preñadas dentro del primer mes postparto. Para lograr esto los criadores se ven forzados a preñar a las yeguas madres en su primer estro postparto, en lo que conocemos como celo del potro (CDP). Por lo que servir a las yeguas en CDP, el cual comienza entre los días 5-12 luego del parto es un método para mantener la producción de un potro por año. Esto no solo permite evitar retrasos en los nacimientos del próximo año, sino que también reduce la posibilidad de períodos anovulatorios que imposibiliten el servicio de yeguas paridas tempranamente.¹⁷

La yegua es considerada una especie poliéstrica estacional que, en función de la latitud, presenta cambios en el ritmo circanual de la reproducción, de tal manera que exhibe actividad ovárica máxima durante primavera y verano, 15 a 16 horas de luz, y periodos de no actividad en los meses de invierno como respuesta a mayor liberación de melatonina (ML), la cual ejerce su acción sobre receptores específicos acoplados a una proteína G, en el sistema nervioso central, lo que inhibe la liberación de GnRH por parte del hipotálamo y tiene como consecuencia la disminución en la liberación de gonadotropinas. Esto genera el bloqueo de la dinámica folicular, ya que los niveles de FSH no son suficientes para que ocurra la segunda activación denominada activación de folículos terciarios o antrales. Esta activación, en el caso particular de las especies fotoperiódicas, ocurre solamente en la temporada de transición y en la reproductiva.²²

Aparato reproductor de la yegua.

Los órganos del tracto reproductivo de una hembra no solo son dinámicos en su fisiología, sino también en cuanto a su morfología. La anatomía de los órganos reproductivos femeninos está fuertemente influenciada por la edad, su estado actual y la historia reproductiva previa. La descripción que se realiza identifica un estado inicial o perinatal de desarrollo y luego, especialmente, nos referimos a estas características en la yegua madura. El tracto reproductivo de la yegua se encuentra suspendido por una lámina doble de peritoneo, denominada ligamento ancho, sostiene los ovarios, oviductos, útero, cérvix y la parte craneal de la vagina, el cual se une a la pared abdominal en la región sublumbar, dorsalmente a la vejiga.¹⁶

Ovarios.

Los ovarios se encuentran en la región sublumbar, por debajo de la cuarta o quinta vértebra lumbar.

Los ovarios cumplen una función gametogénica y una endocrina. Los gametos se presentan en gran cantidad al momento del nacimiento y no aumentan durante la vida del animal. Los ovarios presentan forma de riñón y su tamaño varía según la edad de animal y la estación del año.

La superficie ovárica está cubierta en gran parte por el peritoneo, excepto en el borde adosado al ligamento ancho donde entran los nervios y los vasos. Se dice que el ovario de la yegua tiene la particularidad de estar "invertido" en comparación con los ovarios de otras especies. En otras palabras, la zona medular o vascular es superficial y la zona cortical (que contiene los folículos) está en el interior de la gónada. El tejido cortical llega a la superficie sólo en la depresión del borde ventral o

libre. Esta es por tanto la única zona donde se da la ovulación y se denomina fosa de ovulación. La fosa de ovulación está cubierta por una capa de células poligonales cortas que son un remanente del primitivo epitelio germinal.²³

Útero.

El útero es un órgano muscular hueco, contiguo a las trompas hacia posterior y que se abre a la vagina por medio de una estructura llamada cérvix. Se halla suspendido en la región sublumbar por medio de repliegues de peritoneo (ligamento ancho). Consta de dos cuernos de 25 cm de largo aproximadamente y un cuerpo de aproximadamente 20 cm de largo por 10 cm de ancho y el cérvix de 7 cm de largo por 4 cm de ancho.¹⁰

La pared de útero tiene tres estratos: una externa (serosa) que se continúa formando el ligamento ancho; una capa muscular (miometrio) que contiene un estrato externo de fibras longitudinales y uno interno de fibras circulares; y una capa interna (endometrio) constituida por el epitelio, un estroma conectivo y glándulas con sus respectivos conductos. Está irrigado por la arteria uterina, la arteria vaginal y por la rama uterina de la arteria uteroovárica. Su inervación proviene de los plexos simpáticos uterino y pélvico.³

Vulva.

La vulva está tapizada por una membrana mucosa, se continua anteriormente con la vagina y se abre posteriormente unos 7 cm por debajo del ano. Consta de dos labios unidos por una comisura dorsal y una ventral.

El clítoris, homólogo femenino del pene, se encuentra dentro de la comisura ventral de la vulva. El desarrollo del clítoris es muy variable y depende de cada individuo.⁵

Ciclo estral.

El ciclo estral se define como el periodo entre dos ovulaciones seguidas, acompañadas por un estro y concentraciones plasmáticas de progesterona por debajo de 1 ng/ml, pudiéndose dividir en fase folicular (proceso ovulatorio) y lútea (diestro).⁷

El ciclo estral es la secuencia repetida de eventos después de la pubertad, que preparan a la yegua para la concepción; está determinado por el periodo entre dos ovulaciones seguidas, acompañadas de signos de estro y concentración de progesterona superior a 1 ng/ml. Es controlado por un complejo sistema neuro-endocrino donde se destaca la acción del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, y la acción endocrina de la glándula pineal y endometrio entre otras, puesto que factores inherentes al animal, como factores medioambientales, generan señales nerviosas estimulantes o bloqueadoras de la liberación por parte del hipotálamo al sistema portal del factor estimulante de las gonadotropinas (GnRH); este decapeptido, a su vez, estimula a nivel hipofisario la liberación de gonadotropinas (FSH y LH), que actúan directamente sobre el funcionamiento gónada.

Con ello se inicia la fase lútea, donde posteriormente se desarrolla el cuerpo lúteo y subsecuente secreción de progesterona (P4), preparando a la yegua para llevar a cabo la gestación. De lo contrario, las glándulas endometriales, mediante la producción de la prostaglandina F2 α y el sistema de transporte contra corriente en la arteria útero ovárica, generan lisis del cuerpo lúteo en aquellas yeguas en las que no se presentó el proceso de reconocimiento materno de la gestación.²⁰

La regularidad del ciclo estral está determinada por el balance de las hormonas producidas por la glándula pineal, el hipotálamo, la hipófisis, los ovarios y el endometrio. El hipotálamo se considera como un punto clave de control reproductivo ya que los gonadotropos secretan la hormona GnRH, decapeptido que se libera en

el sistema portal hipotalámico- hipofisario para estimular la síntesis y la liberación de las gonadotropinas: hormona folículo-estimulante (FSH) y luteinizante (LH), las cuales son responsables de la dinámica folicular ovárica, la producción de estrógeno, la ovulación y la luteinización del cuerpo lúteo. En conjunto con otras hormonas como el factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF-1), la proteína plasmática asociada a la preñez (PPAP-A) y otras, controlan los principales signos externos de comportamiento del estro y los eventos que determinan la ovulación.⁴⁰

La fase folicular, también conocida como el estro, varía en su duración de 4 a 7 días en la yegua. Esta acompañada de crecimiento folicular, selección, maduración y luego de la ovulación, presentándose una rápida disminución de las concentraciones plasmáticas de estrógeno. La fase luteal o diestro se considera como el periodo restante del ciclo estral, esta fase dura alrededor de 14 a 15 días, variando de acuerdo con la duración del estro. Se inicia con la ovulación, la formación del cuerpo lúteo y posteriormente la secreción de progesterona. El incremento en la concentración sérica de LH ocurre de forma lenta, alcanzando una concentración máxima después de 24 horas de la ovulación.²⁵

La duración media del ciclo estral en la yegua es de 21 días (19-22). Se divide en dos fases: (1) estro (fase folicular), con una duración oscilante entre 5-7 días y (2) diestro (fase lútea), que tiene una duración oscilante entre 14-15 días. En la fase folicular hay un aumento en la producción de estrógenos (E2) por parte de los folículos que se encuentran en crecimiento, generando receptividad sexual por parte de la hembra hacia el garañón, además de la preparación del aparato genital para el transporte de los espermatozoides hacia el útero, región en el oviducto donde se lleva a cabo el proceso de fecundación del ovocito, liberado 12- 24 horas antes de finalizar el periodo receptivo.⁸

Con ello se inicia la fase lútea, donde posteriormente se desarrolla el cuerpo lúteo y subsecuente secreción de progesterona (P4), preparando a la yegua para llevar a cabo la gestación. De lo contrario, las glándulas endometriales, mediante la

producción de la prostaglandina F2 α y el sistema de transporte contra corriente en la arteria útero ovárica, generan lisis del cuerpo lúteo en aquellas yeguas en las que no se presentó el proceso de reconocimiento materno de la gestación.²

Dinámica folicular ovárica

En las yeguas, así como en la mujer, el ciclo estral se caracteriza por presentar ondas de crecimiento folicular ovárico, con dos patrones típicos: onda folicular mayor, que posee folículos dominantes y subordinados, pudiendo normalmente iniciar en la segunda mitad del ciclo estral y termina con la posterior ovulación, y una onda folicular menor, en donde el folículo mayor no alcanza el diámetro necesario para promover la divergencia entre los futuros folículos subordinados, iniciándose al final del estro hasta el inicio del diestro. Las ondas que emergen en la segunda mitad del ciclo estral y culminan con la ovulación se clasifican como foliculares primarias, y las ondas que surgen entre el final del ciclo y el inicio del diestro se denominan secundarias. El inicio de una onda de desarrollo folicular se estimula por el aumento en FSH, que en la especie equina es la responsable del reclutamiento de los folículos con diámetro de aproximadamente 13 mm. Después de cuatro a cinco días, la concentración de FSH alcanza su valor máximo en sangre y los dos folículos mayores alcanzan un diámetro promedio de 19 a 22 mm. En este momento, los folículos inician la divergencia en diámetro, que se caracteriza por la selección y el crecimiento continuo de un folículo mayor, que será considerado como dominante, reduciéndose el crecimiento en los folículos remanentes, tornándose como subordinados.³⁰

La diferencia de diámetro entre los dos folículos mayores, al inicio de la divergencia, es equivalente a un periodo de crecimiento de aproximadamente 24 horas. Aparentemente, este es el momento en que el folículo más grande (dominante)

establece el dominio en el proceso, antes que el folículo de tamaño inferior (secundario) pueda alcanzar un diámetro similar al dominante. En este instante, el futuro folículo dominante (FD) ejerce un papel primario de supresión de la concentración de FSH circulante.¹⁴

El crecimiento del FD, después del proceso de selección, es menos dependiente de FSH, cuya concentración se mantiene en niveles basales debido a la producción de estrógeno (E2) e inhiba, que generan una retroalimentación negativa en la hipófisis. Sin embargo, el mantenimiento de una concentración mínima plasmática de FSH es esencial para su supervivencia, siendo que niveles por debajo del nivel basal predisponen a la atresia del folículo dominante.³¹

Después del proceso de selección, el crecimiento y la actividad estrogénica del folículo son controlados por los pulsos de LH. El folículo seleccionado puede superar la dependencia a la FSH, llegando a ser extremadamente sensible a la pulsatilidad de la LH y adquiriendo receptores para esta hormona en las células de la granulosa, como también para la síntesis de enzimas esteroidogénicas que son fundamentales para la expresión génica de la enzima aromatasa (convierte androstenediona a estradiol) en las células de la granulosa.⁴⁴

La dependencia de concentraciones menores de FSH para mantener el crecimiento del FD coincide con la elevación en la concentración de estradiol, asociada a factores de crecimiento locales y a menores concentraciones de proteínas ligadoras del factor de crecimiento parecido a la insulina (IGFBP-2, 4 y 5), lo que permite que se dispongan mayores concentraciones intrafoliculares de IGF-1 libres, induciendo la expresión de receptores para la LH y regulando la actividad de la aromatasa.⁵¹

Los IGF, tipo 1 y 2, estimulan la actividad mitogénica y esteroidogénica de las células de la teca y de la granulosa por medio de mecanismos endocrinos, autocrinos y paracrinos, amplificando los efectos endocrinos de la FSH y permitiendo al futuro FD una rápida regulación de la producción de estradiol. De esta manera, la

supresión de la FSH circulante, por medio de la elevación en la concentración de estradiol, previene que los folículos subordinados adquieran la dominancia sin que haya interferencia en el desarrollo del folículo seleccionado para ovular.³⁷

Asociado al IGF-1, los folículos dominantes presentan un aumento en las concentraciones de PAPP-A que promueven un rápido cambio en las concentraciones intrafoliculares de IGFBP, para degradar los dos subtipos de proteínas ligadoras (IGFBP-4 e 5) y, consecuentemente, llevan a un aumento en los niveles intrafoliculares de IGF-1. Las concentraciones intrafoliculares de IGF-1 y de IGFBP-3 permanecen relativamente constantes durante el crecimiento folicular. Sin embargo, los niveles de IGFBP-2, 4 y 5 varían bastante, indicando que la biodisponibilidad de IGF-1 en el folículo es dictada por cambios en los niveles de IGFBP. ⁶

Reconocimiento materno de la preñez

Entre el quinto y sexto día el embrión en estado de mórula entra al útero y comienza la fase de migración embrionaria proceso necesario para el "reconocimiento materno de la gestación". La migración embrionaria es máxima a los 11-12 días y se mantiene así hasta el día 15. Este movimiento de la vesícula es pasivo y depende de las contracciones uterinas y es importante para establecer la "señal " de que la preñez ha ocurrido, previniendo así la luteolisis, lo que se conoce como "reconocimiento materno de la preñez".¹²

En la yegua el cuerpo lúteo primario que originó la preñez podrá ser identificado hasta el día 180-220. Ciertas condiciones que eviten esta migración (por ej. quistes que bloqueen un cuerno uterino) van a interferir en el reconocimiento materno de la preñez, resultando en una producción y liberación de PGF2 α , por parte del endometrio, volviendo la yegua a retomar el ciclo estral.²⁸

Tratamiento para ovulación

El control de la ovulación es un punto clave en el manejo reproductivo de la yegua. Por esta razón la inducción de la ovulación es una práctica frecuente dentro del manejo reproductivo en los diferentes criaderos del país, buscando reducir el número de inseminaciones, la duración del ciclo y el intervalo hasta la ovulación, lo que aumenta las tasas de fertilidad. La GnRH y la hCG son agentes frecuentemente utilizados para inducir la ovulación en la yegua. El análogo de GnRH, Deslorelin, es un producto avalado para el uso en yeguas a dosis total de 2,2 mg, el cual ejerce su mecanismo de acción estimulando los gonadotropos en la adenohipófisis a liberar LH, y la posterior unión de la LH a receptores ováricos para la maduración folicular y subsecuente ovulación aproximadamente 48 horas pos aplicación intramuscular. En cambio, la gonadotropina corionica humana (hCG) es una hormona glicoproteína extraída del útero de mujeres gestantes que, en la yegua, al aplicarse vía intramuscular a dosis de 1500 – 4000 UI, estimula la ovulación actuando como LH, al unirse a los receptores para LH en las células de la granulosa y células tecales en el ovario. La ovulación se produce aproximadamente 36 horas pos aplicación de la hCG y su aplicación al igual que el Deslorelin debe hacerse a partir de un diámetro folicular igual o mayor a 35 mm, para obtener mejores resultados. Otros factores como el momento de la aplicación influyen en el efecto de la hCG, puesto que la aplicación de 2000 UI de hCG en horas de la tarde, noche y mañana adelanta 2 horas el momento de la ovulación comparado con la aplicación de hCG al medio día en yeguas Silla Argentina durante la estación reproductiva.³⁹

Al realizar aplicaciones continuas de hCG para inducir la ovulación en yeguas, es posible que estas generen anticuerpos contra esta hormona, interfiriendo posiblemente con el proceso de la ovulación. En la Universidad de Colorado han

reportado intervalos menos predecibles en la inducción de la ovulación, tras la administración de hCG en yeguas que han recibido el fármaco en más de dos periodos estrales anteriores. Aunque estudios realizados por la Universidad Estatal de Ohio afirman que la inyección intravenosa de hCG resulta menos probable para inducir la respuesta humoral, obteniendo resultados similares en cada inyección de hCG en yeguas tratadas en un máximo de 4 ciclos estrales, dentro de la misma temporada de monta, o hasta 7 ciclos estrales diferentes en 2 años consecutivos.⁵⁶

El éxito de la inducción de la ovulación en yeguas cíclicas mediante la administración de dosis únicas de GnRH, no ha tenido el resultado deseado. En cambio, los análogos de la GnRH como el Deslorelin, han demostrado ser altamente exitosos para inducir la ovulación puesto que son más potentes y poseen vida media más larga, reportando mayor eficacia clínica que la hCG en folículos grandes de pared gruesa.⁴⁷

INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN EQUINOS

INTRODUCCIÓN

La recogida de semen se ha convertido en una técnica habitual en la clínica de reproducción equina, se emplea para evaluar la capacidad reproductiva de los sementales, el control rutinario de la calidad del semen, el diagnóstico de la infertilidad y por su puesto la inseminación artificial ya sea con semen fresco, refrigerado o congelado.⁵⁹

La inseminación artificial se ha desarrollado enormemente en los últimos años debido a las ventajas que aporta a la cría equina, podemos destacar el aumento del

número de yeguas cubiertas por cada semental (de 40 de media pueden llegar a 120 ó incluso 150), la mejora de los índices de concepción de algunos sementales y yeguas subfértiles, la posibilidad de almacenamiento y transporte del semen y la disminución de los accidentes en los animales y las personas ocurridos durante la cubrición. Cuando se aplican en forma adecuada las técnicas actuales de inseminación artificial pueden dar como resultado tasas de concepción iguales o incluso superiores a las obtenidas mediante monta natural.²⁶

En la especie equina encontramos un número importante de problemas reproductivos asociados al semental, algunos de ellos están relacionados con la producción y calidad seminal y el análisis de semen es un arma imprescindible para el diagnóstico y seguimiento de estos casos. En otros casos alteraciones de la libido, dificultades en la erección, la monta o la eyaculación e incluso problemas psíquicos pueden resultar factores limitantes que determinen una disminución de los parámetros reproductivos de la yeguada, y que deben ser también evaluados y tratados correctamente.³²

El método de elección para la recolección de semen en los caballos es la vagina artificial, la mayoría de los sementales pueden ser entrenados para eyacular en una vagina artificial, pero en algunos casos y por diversas razones debemos emplear otros métodos alternativos que nos permitan obtener y evaluar una muestra representativa de la producción seminal.¹³

En este trabajo se discute brevemente el empleo de la vagina artificial y se describen algunas otras alternativas existentes para la recolección del eyaculado equino realizando una descripción de los casos en que está indicado su uso, el material y métodos necesarios para obtener el semen y las características del eyaculado obtenido.⁴

INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

Los métodos que hoy en día existen para la cubrición de las yeguas han cambiado totalmente el panorama de la cría de los caballos de deporte (en los PSI sólo está aceptada la monta natural).¹

- Si bien es cierto, que aún el método de monta natural es el que da mayor fertilidad.

- En la inseminación artificial se pueden usar dos métodos: mediante semen fresco y mediante semen congelado.

- La inseminación con semen congelado permite, cuando la yegua es idónea para este método, la utilización de cualquier semental que sus pajuelas sean fértiles.

- En el caso de tener que utilizar semen fresco, se evita que el semental tenga que aparear a la yegua, que siempre es perjudicial para el caballo de deporte tanto por lo que puede afectarle en su carácter como por el posible riesgo de accidentes

- La utilización de semen fresco produce más fertilidad que la utilización de semen congelado. La razón estriba en la mayor vida de los espermatozoides del semen fresco.

- El semen congelado es de poca efectividad en yeguas mayores, en yeguas que han tenido abortos y aún más en yeguas mayores que no han parido (primíparas).

- Es importante tener en cuenta esta cuestión pues inseminar yeguas inadecuadas con semen congelado es una equivocación, que en la mayoría de los casos supone una pérdida económica para el ganadero y tan bien una desilusión.

- Muchas veces se adquieren yeguas que por sus orígenes pueden ser buenas madres, pero hay que tener en cuenta que no podremos cubrirlas con el semental deseado si la disposición de éste es sólo por semen congelado.

- La transferencia de embriones es una técnica completamente diferente, no exenta de complicación y cara, que merece un estudio aparte.

- Según los estudios de los Criaderos Nacionales Franceses, el tanto por ciento de fertilidad, según el método de cubrición empleado, es el siguiente:

Posición	Fertilización con	% Obtenido
1	Monta natural	57 %
2	Semen fresco	53 a 55 %
3	Semen congelado	46 a 49 %

(Cuadro 1.0)

EQUIPO UTILIZADO PARA LA RECOLECCIÓN DEL SEMEN EQUINO

VAGINA ARTIFICIAL

Como hemos indicado previamente la vagina artificial es el método de elección para la recogida del semen en los caballos, mediante esta técnica podemos obtener una muestra del eyaculado con las mismas características que el de una monta natural. La mayoría de los sementales aceptan la vagina artificial sin que esto afecte a su comportamiento sexual pudiendo alternar recogidas con vagina artificial y monta natural.⁹

Todas las vaginas artificiales consisten en una caja externa y un forro interno de látex entre los cuales se infunde agua tibia y/o aire para proveer la presión y temperatura adecuadas. Normalmente empleamos temperaturas de 42 a 45°C, hasta un máximo de 50°C; cuando el caballo presenta problemas para eyacular es conveniente elevar ligeramente la temperatura de la vagina artificial para mejorar el estímulo sobre el pene, por el contrario, una temperatura demasiado elevada provocará el rechazo del caballo a la vagina. ¹⁵

El uso de altas temperaturas en la vagina artificial puede provocar además urospermia. Como en muchos otros aspectos encontraremos preferencias individuales respecto a la temperatura interna de la vagina. El grado de presión dentro de la vagina artificial también tiene un efecto directo en la eyaculación; debe ser suficientemente alta para permitir el contacto y la estimulación del pene, pero no

debe restringir la penetración o expansión del miembro a su estado de plena erección.⁵⁷

Con sementales especialmente difíciles es conveniente usar un termómetro para controlar la temperatura interna y pesar la vagina artificial llena o llenarla con una bomba y un manómetro con el fin de que las condiciones no varíen entre recolecciones.⁹⁰

En el momento previo a la recolección la vagina artificial se lubrica con una pequeña cantidad de gel estéril, debiéndose evitar los lubricantes bacteriostáticos ya que suelen ser espermicidas, una buena lubricación favorece la cópula y la eyaculación. Existen en el mercado camisas desechables para la mayoría de estos modelos lo que nos permite una recogida más higiénica, pero, así como el látex es casi siempre bien tolerado muchos caballos rechazan el tacto del plástico.⁶⁸

Existe una gran variedad de modelos de vaginas artificiales en el mercado, y los sementales pueden mostrar predilección por uno u otro modelo en función de sus características.³⁵

La vagina Missouri o Nasco es posiblemente la más común y está constituida por un forro de látex doble termosellado que forma una cámara donde se introduce el agua con una válvula que permite la introducción de agua y aire y una funda externa de cuero.⁸¹



Es económica, liviana y de fácil manejo, además permite una estimulación externa del glande del semental (efecto cervix) o de la base del pene. (figura 1.0)

El Modelo japonés o Nishikawa está formado por una caja externa de aluminio y un forro de látex y en el extremo distal tiene una anilla de goma espuma para estimular el glande durante la penetración. ⁸⁴

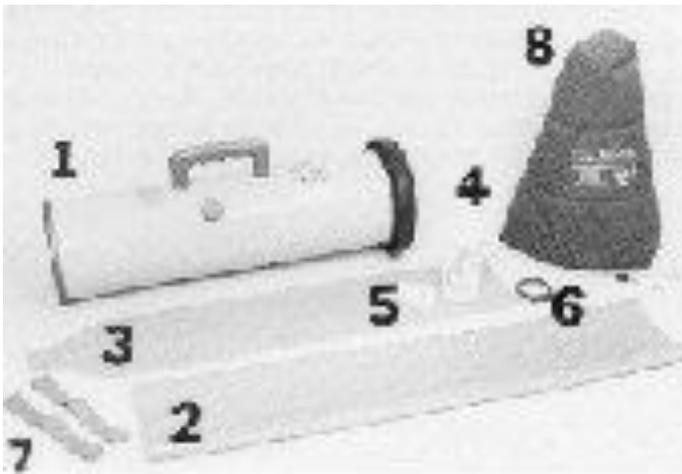


Es rígida y cuenta con un bulbo de goma para la recogida del semen. (figura 1.1)

Es rígida y cuenta con un bulbo de

El Modelo Roanoke es parecido al japonés, pero de material plástico y de tamaño más corto y es muy útil para sementales de pequeño tamaño.

Los modelos Colorado, Lane y CSU son muy similares, la carcasa externa es de plástico y usa dos forros de látex, con el primero se construye una cámara entre la carcasa externa y el forro donde se introduce el agua y el segundo forro sirve para la recolección colocando en su extremo distal el recipiente de recolección.⁶⁰



La principal ventaja de estas vaginas es que mantienen la temperatura del agua durante mucho tiempo, pero son más pesadas y como desventaja no permite la estimulación manual del pene.⁴⁸ (figura 1.2)

La principal ventaja de estas vaginas es que mantienen la temperatura del agua durante mucho tiempo, pero son más pesadas y como desventaja no permite la estimulación manual del pene.⁴⁸ (figura 1.2)

El modelo Hannover es igual a los descritos anteriormente con la salvedad de que su extremo distal tiene una pared que estimula el glande durante la penetración, el ya nombrado efecto cerviz.¹⁸



La vagina polaca es un modelo abierto en su extremo distal lo que nos permite la recogida fraccionada del semen. (figura 1.3)



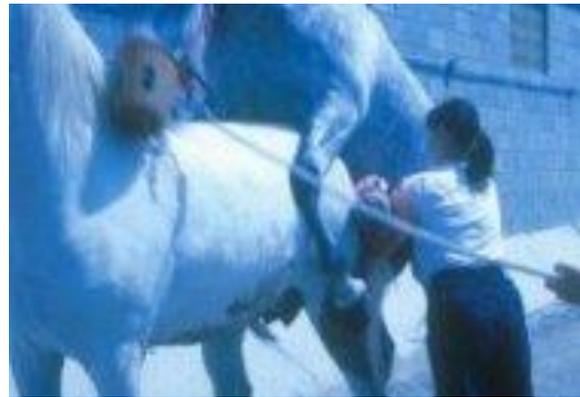
Este método es usado en los Países del Este de Europa y permite recoger sólo los tres primeros chorros del eyaculado que contienen más del 70% de los espermatozoides. (figura 1.4)

Este método de recogida precisa más operarios, pero permite obtener eyaculados concentrados eliminando la necesidad de la centrifugación en las manipulaciones posteriores para la congelación del semen.¹¹

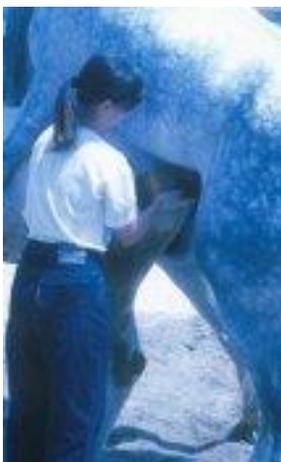
SISTEMAS TRADICIONALES Y ALTERNATIVOS EN LA RECOLECCIÓN DEL SEMEN EQUINO

Para llevar a cabo la recolección necesitamos de una yegua en celo o de un maniquí, una vez que el semental monta a la yegua, el pene es desviado hacia un lado y dirigido hacia la vagina artificial.²¹

Generalmente la vagina artificial se mantiene inmóvil, con su extremo distal elevado y apoyada contra la yegua o el maniquí, en algunos casos puede requerirse un estímulo adicional que puede aplicarse comprimiendo el glande (efecto cervix), aplicando masajes o paños calientes en la base del pene o empujando la vagina hacia el caballo.⁷⁵



La sensación de falta de estabilidad también puede inhibir la eyaculación en el caballo, debemos asegurarnos que la yegua o maniquí presentan un tamaño adecuado, y si se trata de un semental con problemas de estabilidad podemos ayudarlo colocando la yegua más baja, sujetando las extremidades anteriores o permitiéndole una zona de agarre con la boca.⁷³(figura 1.4, 1.5)



Durante la recolección el operador puede colocar sus dedos bajo la parte ventral del pene para detectar las pulsaciones uretrales de la eyaculación, en ese momento debemos bajar la parte distal de la vagina para permitir que el semen pase rápidamente al recipiente de recolección ya que el contacto del semen con el látex y la vagina caliente puede alterar la calidad de los espermatozoides.⁷⁸ (figura1.6)

El uso de un maniquí en lugar de la yegua provee de una monta más estable y reduce la variabilidad de las condiciones entre las recolecciones, reduciendo además el riesgo de accidentes para los animales y los operadores.⁶⁵



Si la falsa yegua es de altura ajustable se puede acomodar a sementales de diferente alzada.⁶¹ (figura 1.7)

Así mejora mucho la estabilidad de los caballos con alteraciones de las extremidades posteriores, del dorso o con incoordinación.

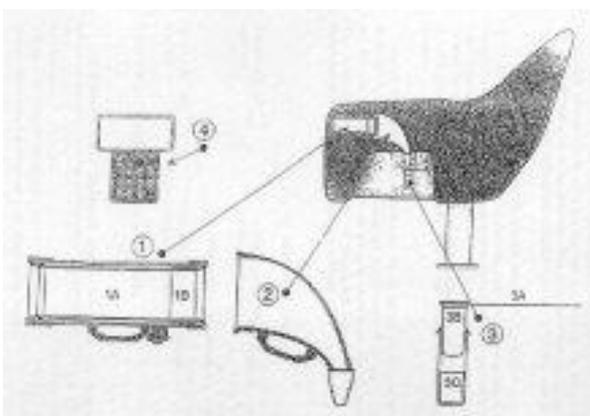


La utilización del maniquí requiere un periodo de entrenamiento.⁶⁹ (figura 1.8)



Inicialmente se coloca una yegua en estro junto al maniquí como estímulo sexual y tras varias recogidas y una vez que el macho asocia el maniquí con la monta y la eyaculación la hembra puede ser alejada y eventualmente se podrá

prescindir de ella.⁸⁹ (figura 1.9)



Existe un modelo nuevo de maniquí, el modelo Equidame ® phantom, que lleva incorporada una vagina artificial abierta en su interior y un sistema computarizado

para la recogida de las distintas fracciones.⁸⁷ (figura 2.0)

PRESERVATIVO

El preservativo se emplea cuando no se dispone de vagina artificial o bien el caballo no la acepta, el preservativo se coloca sobre el pene en erección y debe recuperarse inmediatamente después de la cubrición evitando que caiga al suelo. ⁸⁶



La muestra obtenida mediante el preservativo es completa y representativa, sin embargo, debemos tener en cuenta que está más contaminado con bacterias y detritus del exterior del pene que el recolectado en vagina artificial.⁷¹ (figura 2.1)



Además, el contacto prolongado de los espermatozoides con el látex puede alterar su motilidad, por estas razones y la incomodidad en su uso no debe ser empleado como primera opción para la obtención del semen.⁶³ (figura 2.2)

No todos los caballos aceptan la manipulación necesaria para la colocación del preservativo o consiguen eyacular en él, en nuestra experiencia la mayoría de los caballos que rechazan la vagina artificial tampoco consiguen eyacular en un preservativo. ³⁴

MASTURBACIÓN

La masturbación consiste en realizar la recogida del semen mediante el masaje del pene del caballo, normalmente con éste en estación sobre sus cuatro extremidades. Este tipo de recolección lleva consigo una labor ardua durante el periodo de entrenamiento, pero suele ser bien aceptado por los animales y es muy práctico y eficaz una vez que el semental está acostumbrado. ²⁹



La técnica consiste en colocar al semental en un potro de sujeción y excitarlo con una yegua en celo, con el pene en erección se coloca una bolsa sobre el glande y con unas compresas atemperadas a 45 °C colocadas una en el glande y otra en la base del pene masajear hasta que se produce la eyaculación. ²⁷ (figura 2.3)

Otras variaciones de la misma técnica emplean la vagina artificial para estimular el pene o permiten la monta del animal sobre una yegua o un maniquí tomando entonces el pene y masajeándolo con el caballo en posición bípeda.⁵⁵

Esta técnica es de elección en caballos con problemas del aparato locomotor que les impidan o dificulten la monta o con problemas como ataxia o incoordinación ya que permite que la eyaculación se realice en una postura mucho más estable.⁸⁵

Presenta también otras muchas ventajas, por ejemplo, la muestra que se obtiene es perfectamente representativa y la contaminación es mínima, se puede realizar además la recogida fraccionada del semen y requiere un equipamiento mínimo y una sola persona como recolector. Una vez el semental ha sido entrenado se puede repetir con la frecuencia necesaria sin afectar al comportamiento sexual del animal.⁶⁶

EXCÓPULA

Consiste en la utilización de fármacos para provocar la eyaculación de los sementales y puede ser una alternativa a problemas como la falta de libido o problemas de erección, monta o eyaculación.²⁴



A pesar de los numerosos estudios realizados en este campo todavía no están muy claras las vías nerviosas y los receptores que la desencadenan. De las distintas teorías, parece que la más apoyada es la que la eyaculación está

mediada por receptores alfa adrenérgicos.⁶⁴ (figura 2.4)

En la bibliografía podemos encontrar descrito el uso de varios fármacos a fin de provocar la eyaculación excópula en équidos:

La Xilacina provoca la eyaculación el 25% de las veces. Clomipramina hydrochloride; en combinación con Xilacina. - Imipramina; en bajas dosis en équidos produce erección y masturbación. Imipramina en combinación con Xilacina funciona el 33% de las veces Detomidina.¹⁹

Para la recogida necesitamos un ambiente muy tranquilo para los sementales, la excitación previa está descrita por algunos autores que produce un aumento de recolecciones.³⁶



Una vez decidido el producto y la dosis a usar, se inyecta el fármaco y permaneceremos en silencio cerca del semental, agachados y con un

recipiente de recogida de boca amplia.⁸² (figura 2.5)

En poco tiempo, unos 10 min., se produce la profusión o erección; la eyaculación se produce independientemente a éstas entre los diez minutos y media hora después de la aplicación del fármaco.⁴¹

Se usan también arneses de recogida que nos permiten dejar al semental sólo y recoger el eyaculado una vez pasado el tiempo de espera, favoreciendo así un ambiente totalmente tranquilo el cual favorece la eyaculación.⁵⁴

En un estudio realizado en España se utilizaron varios agonistas de receptores alfa₂ adrenérgicos para provocar la eyaculación excópula y comparar la calidad seminal de estos eyaculados.⁷²

Los fármacos usados fueron:

- Detomidina 50% de la dosis de tranquilizarían (2 mg/ 100Kg p.v.)
- Romifidina 75% de la dosis de tranquilizarían (80 ng/ 100 Kg p.v.)
- Xilacina 100% de la dosis de tranquilizarían (1,1mg/ Kg p.v.)-

Obteniéndose como resultado

- A. 12,5% de eyaculaciones con la Detomidina,
- B. 25% de eyaculaciones con la Romifidina
- C. 37,5% de eyaculaciones con la Xilacina.

En cuanto a la calidad seminal sólo el volumen y la concentración seminal presentaron diferencias significativas con los valores seminales obtenidos de los mismos sementales con vagina artificial.⁶⁷

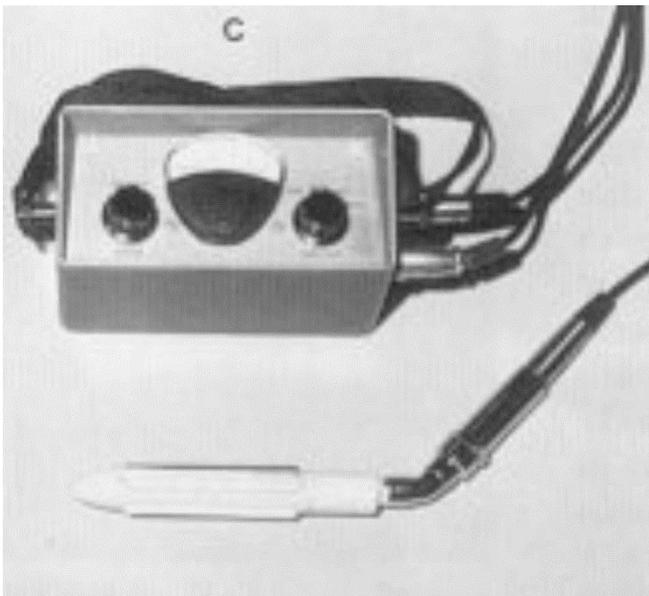
Siendo el volumen significativamente menor y la concentración mayor en la eyaculación ex cópula, pero permanecieron sin diferencias el número total de espermatozoides y la motilidad tanto total como progresiva. ⁸⁰

Según nuestra experiencia la fertilidad del semen obtenido con este sistema de recogida es similar al del semen obtenido con vagina artificial y existen referencias bibliográficas que así lo indican. ⁵⁸

En el Hospital Clínico Veterinario de Madrid se obtuvieron 8 potros conseguidos con este sistema, nacidos en este año son hijos de un semental de 12 años de edad, de raza cruzada, usado para el rejoneo; que nos fue remitido por problemas de fertilidad; el semental sufre de fallo en la eyaculación. ⁵³

ELECTROEYACULACIÓN

Utilizando un electro eyaculador que produce descargas eléctricas de diferente intensidad y con frecuencia programable se excitan las vesículas seminales pudiéndose obtener un eyaculado. ³⁸



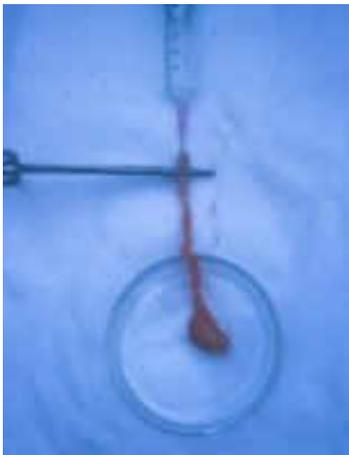
Esta técnica es muy utilizada en otras especies como en el vacuno o en especies salvajes para creación de bancos genéticos, pero en los équidos produce un gran sufrimiento que incluso puede llegar a la muerte del semental. ³³ (figura 2.6)

Además, la muestra recogida es de peor calidad por lo que es mucho más conveniente el uso de otras técnicas como la recolección manual o la vagina artificial.

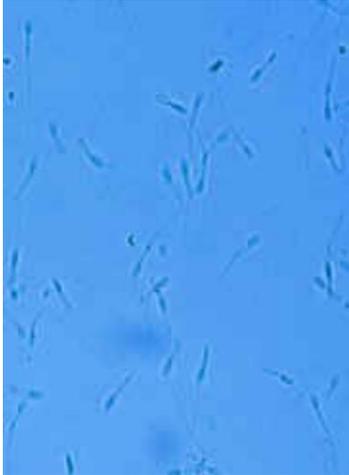
EXTRACCIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE CONDUCTO EPIDIDIMARIO



Los espermatozoides de epidídimo pueden obtenerse post mortem o tras una castración, de hecho, el primer potro nacido de semen congelado se obtuvo a partir de espermatozoides de epidídimo.⁸³ (figura 2.7)



Para la obtención de los espermatozoides se disecciona el epidídimo y se coloca una cánula en el conducto deferente, posteriormente se secciona el epidídimo en la zona de unión entre el cuerpo y la cola del epidídimo y se realiza un lavado retrógrado de la cola del epidídimo con un diluyente adecuado.⁸⁸ (figura 2.8)



En la muestra recogida encontraremos un gran número de espermatozoides inmaduros, que se caracterizan por tener gotas citoplasmáticas. Además, la muestra presentará una baja motilidad, debido a que los espermatozoides no han estado en contacto con el plasma seminal, cuando la recolección se realiza postmortem el estado de las células suele ser muy deficiente, ya que los espermatozoides son especialmente sensibles a la hipoxia, la acción de los fármacos y la endotoxemia, la obtención de semen en animales muertos por cólico o enfermedades que han precisado tratamientos farmacológicos no obtiene buenos resultados. ⁷⁹ (figura 2.9)

TRANSPORTE DE SEMEN EQUINO

Actualmente la mayoría de los registros de razas autorizan la inscripción de potrillos nacidos a partir del uso de semen equino refrigerado. El interés en esta tecnología ha aumentado debido a algunas ventajas precisas obtenidas al servir con semen refrigerado:

- a. La conveniencia de mantener la yegua en su lugar de residencia
- b. Evita el estrés y el costo de enviar a una yegua y su potrillo a otro criadero distante
- c. Reduce el costo de mantenimiento de la yegua en otro criadero

- d. Disminuye las posibilidades de lesiones a las yeguas madres y sus potrillos durante el transporte y estadía en otro criadero

- e. Reduce la probabilidad de transmisión de enfermedades entre criadero

- f. Permite el uso de semental o sementales superiores de difícil acceso a los propietarios de yeguas

- g. Aumenta el pool genético al permitir el uso de mayor número de sementales semental

- h. Permite la evaluación de la calidad y cantidad de los espermatozoides utilizados en la inseminación.

El uso de semen refrigerado también tiene desventajas que deben tenerse en cuenta cuando se decide usar esta tecnología:

- a. Se reduce la fertilidad de los espermatozoides refrigerados de algunos sementales semental
- b. Se debe aumentar la dosis inseminante (número total de espermatozoides) en el semen refrigerado para aumentar la probabilidad de preñez
- c. Puede aumentar el costo y el tiempo empleado en el envío de semen e inseminación de las yeguas especialmente cuando se requieren varios servicios por ciclo estral
- d. Se requiere incrementar el manejo de la yegua para asegurar que el semen es solicitado e inseminado en el momento óptimo durante el estro
- e. Debido a la susceptibilidad del espermatozoide equino a los daños ambientales, la demanda de una técnica superior en el semen transportado y los efectos potenciales de una técnica deficiente sobre la fertilidad, requieren de mayores conocimientos y habilidad de parte del encargado del semental y veterinario actuante
- f. Registro y reglamentaciones sanitarias; No todos los registros de razas equinas permiten la inscripción de potrillos nacidos por inseminación artificial y entre las que lo hacen, no todas permiten el uso de semen transportado refrigerado. Para asegurar total acuerdo con el registro de la raza involucrada, este debe contactarse antes de iniciar la cría con semen refrigerado, y asegurarse que todos los requisitos de inscripción de los potrillos puedan cumplirse
- g. Las reglamentaciones para el envío de semen no están bien definidas. El semen a menudo es transportado a través de los Estados Unidos en aviones de línea comercial o en correo expreso sin certificado sanitario.
- h. Es imperioso contar con reglamentaciones apropiadas para no realizar transporte de semen en forma ilegal. Algunos estados y países tienen certificados con requisitos generales sanitarios, mientras que otros requieren permisos especiales para semen transportado. Por lo tanto, aquellos que

planeen el transporte interestatal o internacional de semen deben seguir los requisitos especificados por el estado o país de destino. Se debe contactar a los veterinarios encargados de la reglamentación para obtener la información específica pertinente.

- i. El transporte de semen fuera de los Estados Unidos debe cumplir las reglamentaciones del país importador. Para obtener una fertilidad aceptable, en la mayoría de los sementales semental, el semen refrigerado debe ser inseminado dentro de las 24 - 48 h después de recolectado, por eso dependiendo de su destino, el semen refrigerado es menos apropiado para envíos intercontinentales.

CONSIDERACIONES SOBRE EL MANEJO DE LA YEGUA

Antes de ser servida la yegua debe ser sometida a un examen reproductivo completo para detectar y corregir cualquier anomalía que pudiera afectar su potencial reproductivo. ⁵²

Los estados corregibles más comunes incluyen el mal estado corporal, las Endometritis y una conformación perineal defectuosa. ⁷⁷

Lo óptimo es examinar las fichas reproductivas o bien monitorear dos o tres ciclos estrales antes de inseminar para establecer la dinámica de su ciclo y el tamaño habitual del folículo ovulatorio.⁷⁴

Cuando se planifica inseminar con semen transportado refrigerado, el propietario de la yegua y/o su veterinario deben obtener información sobre el nivel de experiencia de los criaderos en el procesamiento de semen, en el enfriamiento y transporte, la calidad del semen de ese semental después del enfriamiento y los porcentajes de preñez alcanzados por él con el uso del semen refrigerado. ⁷⁶

Este tipo de información puede ayudar a tomar la decisión de si conviene invertir tiempo, esfuerzo y dinero para criar con determinado semental en particular.

Muchos criaderos hacen propaganda sobre la disponibilidad de semen transportado refrigerado sin documentar la capacidad del semen de ese semental para el enfriamiento y transporte, tampoco diferencian los porcentajes de preñez obtenidos con semen refrigerado de los obtenidos por inseminación con semen fresco o servicio natural.⁵⁰

Las pruebas de fertilidad usando semen equino han dado porcentajes de preñez que varían entre 0% a más de 70% por ciclo, destacando la gran variabilidad que existe entre los sementales en la habilidad de sus espermatozoides para mantener la capacidad fertilizante después del almacenamiento en frío⁴⁵

Los criaderos con experiencia y buena reputación mantienen buenas fichas de sus sementales y deberían desear brindar esa información.

Es importante para el éxito, la comunicación entre los propietarios de la yegua, los veterinarios y los encargados de los sementales.⁴⁶

Una vez que se ha seleccionado el semental, debe contactarse rápidamente al encargado del semental para informarle sobre los planes de servicio de la yegua y obtener información sobre el programa de recolección y envío de semen del semental.⁴⁹

Además de la tarifa del criadero, la información pertinente debe incluir:

- a. El costo adicional de recolección de semen y su envío
- b. Los días de la semana en que se realiza la recolección de semen y si en este programa hay cierta flexibilidad

- c. Con cuanta antelación del envío debe avisarse al encargado del semental
- d. Si hay un límite estacional al número total de dosis que van a ser enviadas para una yegua
- e. Si el semen va a llegar al día siguiente o si puede llegar ese mismo día si fuera necesario
- f. Conque rapidez el recipiente contenedor debe ser devuelto y si existe alguna penalidad asociada con una demora en el retorno. ⁹⁰

SOLICITUD DEL ENVÍO DE SEMEN

El momento óptimo para solicitar el semen va a depender de varios factores incluyendo el tiempo que habitualmente la yegua tarda en desarrollar y ovular sus folículos y por ende el tamaño de su folículo, si se va o no a inducir la ovulación y cuando va a estar disponible el semen para la inseminación. Cuando la yegua comienza el estro en que debe ser servida, debe contactarse el criadero para avisar que la yegua esta en celo y cuándo se supone que se necesitará el semen. ⁶⁵

Es esencial monitorear el estado de los folículos para pedir el semen en el momento justo. Para la mayoría de los caballos de razas livianas, el folículo dominante crece aproximadamente 3 mm por día y la ovulación ocurre cuando el folículo tiene >35 mm de diámetro, por lo tanto, generalmente se pide el semen cuando el folículo dominante tiene 30 a 35 mm de diámetro. ²⁸

El uso de agentes inductores de ovulación aumenta la sincronía entre inseminación y ovulación. Cuando el folículo dominante preovulatorio llega a 35 mm de diámetro,

la ovulación se produce, en la mayoría de las yeguas dentro de las 36 - 48 h después de la administración de hCG (1500 a 3000 unidades, EV o IM) o de colocar un implante de Ovuplant®. ³

Por lo tanto, si se confirma la llegada de semen para el día siguiente, se puede administrar un agente inductor de ovulación cuando el folículo llega a los 35 mm de diámetro y el semen cuando llega al día siguiente puede inseminarse dentro de las 12 a 24 h antes de la ovulación. Si hubiera alguna duda sobre el arribo del semen en ese día, sería prudente retrasar la aplicación del agente inductor de ovulación hasta tener el semen en la mano para reducir las posibilidades de que la yegua ovule antes del arribo del semen. ⁷

PROTOCOLO DE MANEJO DEL SEMEN Y TÉCNICA DE INSEMINACIÓN:

1. Cuando arribe el semen, debe abrirse el recipiente y se debe confirmar la identidad del semental proveedor del semen. Lo ideal es que el semen transportado vaya acompañado por un protocolo con el nombre del semental y del criadero que provee el semen y el nombre de la yegua que debe ser inseminada. Esto es muy importante cuando hay un gran número de yeguas para inseminar y se reciben múltiples envíos de semen de diferentes criaderos o de diferentes sementales de un mismo criadero. ²
2. Una vez que se confirma la identidad del semen, se debe extraer del contenedor, mezclar suavemente y aspirar con una jeringa conectada a una pipeta de inseminación. ¹
3. La yegua se prepara para la inseminación con técnicas asépticas y se insemina de la misma forma que con semen fresco. ¹⁰

4. No es necesario entibiar el semen antes de la inseminación a menos que se use un diluyente de crema y gelatina. Los diluyentes de crema-gelatina son muy viscosos a temperatura de refrigeración y no pueden aspirarse. Estos diluyentes son generalmente entibiados en una estufa o baño de agua a 37 - 38°C hasta que la muestra se torna lo suficientemente fluida para su uso.¹⁶

5. Debe tenerse cuidado de no contaminar la muestra con agua al igual que a cualquier muestra de semen. Una pequeña alícuota debe guardarse y entibiarse a 37°C para observar la motilidad espermática como control de calidad. Lo ideal es usar un microscopio de contraste de fases con una platina termostaticada. Si no se cuenta con ese tipo de microscopio, se debe precalentar la platina de un microscopio convencional y ajustar el condensador y la intensidad de luz para permitir visualizar los espermatozoides.⁶⁶

6. Todo el equipo en contacto con el semen, incluyendo los portaobjetos y pipetas de inseminación deben estar limpios y entibiados para evitar el shock por frío que puede llevar a una evaluación errónea de la calidad del semen. Si la motilidad espermática es muy pobre, debe contactarse al criadero para disponer un envío de semen adicional lo más rápido posible. Es común que las yeguas se preñen con semen con 25% a 30% de motilidad, siempre y cuando el número de espermatozoides sea adecuado ($> 1 \times 10^9$). Sin embargo, en una revisión de fichas de servicio en la Universidad de Texas A&M encontraron que los porcentajes de preñez eran significativamente más altos ($P < 0.02$) en las yeguas servidas con muestras que contenían $> 500 \times 10^6$ espermatozoides con motilidad progresiva que las yeguas inseminadas con muestras que contenían $< 500 \times 10^6$ espermatozoides con motilidad progresiva.⁷⁰

7. Medidas adicionales de control de calidad incluyen la determinación de la concentración espermática y una evaluación de la morfología espermática. La concentración de la muestra puede obtenerse rápidamente realizando el recuento en un hemocitómetro. Se optimiza la motilidad espermática en el semen refrigerado transportado cuando la muestra contiene $25 - 50 \times 10^6$ espermatozoides / ml. La motilidad espermática y la fertilidad pueden verse comprometidas si el semen está muy diluido o muy concentrado. Si se evidencian problemas en la calidad del semen, debe contactarse al encargado del semental y pedir información sobre los procedimientos de procesamiento y envase empleados.⁸⁷

8. Si el análisis de la morfología demostrara un elevado porcentaje de anomalías o si la calidad del semen fuera repetidamente pobre a pesar del uso de buena técnica, entonces deberíamos suponer que el semen del semental no es apropiado para el uso refrigerado.¹³

9. Inseminaciones dobles generalmente los envíos de semen llegan con dos dosis inseminantes. Si la calidad del semen es buena, debería ser suficiente la inseminación de una dosis en el día de llegada.³²

10. La segunda dosis puede mantenerse refrigerada a $<10^{\circ}$ Celsius en un termo y si la yegua no ha ovulado, usarla al día siguiente. Si la yegua ovuló no es necesario una segunda dosis que sólo serviría para introducir más contaminantes en el útero. Además, la motilidad espermática de la mayoría de los sementales declina al continuar en almacenamiento. A pesar de que la calidad seminal puede ser aceptable a las 24 h de almacenamiento puede no ser aceptable a las 48 h. Esto es más notable en algunos recipientes descartables que mantienen el semen por debajo de 10°C durante menos de 36 h aún sin haber sido abiertos.²⁴

11. Si cuando llega, la motilidad es baja, va a empeorar al día siguiente. En esos casos administrar las dos dosis juntas a la yegua ayudaría a aumentar el número de espermatozoides móviles en la dosis inseminante. Esto podría proveer la mejor oportunidad de preñar a la yegua en ese ciclo, especialmente si no se puede lograr que un segundo envío llegue antes de la ovulación.⁵⁶

12. Cuando se utiliza una segunda inseminación, se debe considerar el momento óptimo para realizarla. El intervalo entre inseminaciones recomendado se ubica entre 6 y 24 h, pero no se han realizado pruebas experimentales controladas para demostrarlo. En todas las yeguas se produce cierto grado de inflamación después de la inseminación. Esta respuesta inflamatoria (medida por la afluencia de PMNS) comienza dentro de 0,5 a 1 h, tiene el pico a las 6 a 12 h, persiste durante 24 h y a pesar de seguir presente, a las 48 h disminuye mucho.⁷⁵

13. Los espermatozoides pueden sobrevivir en un útero inflamado, pero los estudios in Vitro han demostrado que las secreciones uterinas del útero inflamado afectan en forma adversa la motilidad espermática. Este efecto deletéreo aparece a las 6 h, es más pronunciado en presencia de PMNS a las 12 h y persiste por lo menos 24 h pos-inseminación.¹²

14. Pruebas de fertilidad realizadas en dos laboratorios diferentes dieron resultados dispares cuando se preguntaban si la inseminación con una dosis después de 24 h de almacenamiento o una dosis doble después de 24 h de almacenamiento o una dosis a las 24 h y una segunda a las 48 h afectaban el porcentaje de preñez. Uno de los estudios no encontró diferencia en los porcentajes de preñez mientras que el otro encontró una leve mejoría en los porcentajes de preñez con el método de dos dosis en dos días. En estos estudios aparece un efecto de semental que sirve para enfatizar que es

importante considerar la calidad del semen después del enfriamiento y la fertilidad inherente del semental para decidir cómo usar el semen cuando se envían 2 dosis.⁸⁰

15. Si la calidad del semen es marginal a las 24 h o si se sabe que la motilidad de los espermatozoides de ese semental declina significativamente después del almacenamiento posterior, ambas dosis deberían inseminarse lo más rápido posible después de su arribo.⁶³

VOLUMEN DE LA INSEMINACIÓN

Servir o no con dos dosis de semen también hace surgir la pregunta sobre el efecto del volumen inseminado en la fertilidad. El número de espermatozoides normales móviles en una dosis inseminante parece ser más crítico para la fertilidad que el volumen inseminado. A pesar que volúmenes pequeños o grandes pueden tener un éxito semejante, el volumen típico para una dosis inseminante para semen refrigerado oscila en un rango de 30 a 120 ml. En la inseminación con semen fresco no se recomiendan los volúmenes excesivamente grandes, porque al estar dilatado el cervix gran parte de dicho volumen puede perderse. Sin embargo, un informe sugiere que la inseminación con hasta 170 ml de semen refrigerado no afectaba en forma adversa los porcentajes de preñez (para estas yeguas se informó una tasa de preñez de 12/13 ó 92%). Cuando se inseminaron yeguas pony con 30 ml ó 120 ml de semen enfriado con una concentración de 50 millones de espermatozoides por ml, las tasas de preñez no difirieron entre los dos grupos (7/9; 78% y 10/10; 100%). Los autores concluyeron que volúmenes de hasta 120 ml de semen enfriado no afectan adversamente la fertilidad siempre que se insemine un número suficiente de espermatozoides con movilidad progresiva¹

DIAGNÓSTICO DE PREÑEZ

Las yeguas inseminadas con semen refrigerado transportado deben examinarse utilizando ultrasonografía transrectal a los 14 -15 días pos-ovulación. Este procedimiento cumple varias funciones importantes. Primero permite el diagnóstico temprano de preñez. Segundo, ayuda a establecer si el concepto y el útero son normales para esa edad de gestación. Tercero otorga suficiente tiempo para contactar al encargado del semental para disponer de semen para el próximo estro si la yegua no ha quedado preñada. Cuarto, permite tomar contacto tempranamente con el encargado del semental y tenerlo informado sobre los resultados de la inseminación para que ellos puedan monitorear las tasas de preñez y por último permite el diagnóstico de mellizos antes de que se fijen.⁴²

PRUEBA AL SEMEN PARA ENFRIAMIENTO Y ALMACENAMIENTO

No todos los sementales producen espermatozoides que soportan el proceso de enfriamiento. Cuando se planifica utilizar sementales para servir con semen refrigerado, deben probarse antes de ser promovidos. La evaluación de la capacidad de los espermatozoides de cada semental para sobrevivir al proceso ayudará a asegurar que la movilidad espermática va a ser aceptable cuando las yeguas sean inseminadas con semen refrigerado.³¹

Si un semental ha estado en reposo sexual debería recolectarse semen varias veces antes de enfriar una muestra para su análisis para eliminar los espermatozoides que pudieran haber estado almacenados en los conductos excretores durante un tiempo prolongado.⁴⁰

Si la calidad espermática es aceptable después de 24 h de enfriamiento, es razonable asumir que el semen del semental va a sobrevivir el proceso de enfriamiento y puede ser usado para inseminar después del enfriamiento y transporte. Estas pruebas van a dar también información sobre el número total de espermatozoides que deben ser envasados para proveer una dosis inseminante refrigerada que maximice las tasas de preñez.³²

El método más exacto para determinar la dosis inseminante, necesaria para un servicio después del transporte es realizar pruebas de enfriamiento del semen individualmente con cada semental.²⁶

El semen se diluye apropiadamente con el diluyente y se refrigera durante 24 horas, después se evalúa la motilidad espermática luego de entibiarlo a 37°C y se calcula el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva después del almacenamiento para asegurar que los envíos van a contener un mínimo de 500 millones de espermatozoides con motilidad progresiva después de 24 horas de enfriamiento y transporte.⁴⁴

Por ejemplo, si después de 24 h de enfriamiento el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva es de 50%, se necesitaría preparar para el transporte mil millones de espermatozoides totales para asegurar una dosis inseminante de 500 millones de espermatozoides con motilidad progresiva después del enfriamiento y transporte.¹³

PROCESAMIENTO SEMEN REFRIGERADO

El semen diluido de sementales fértiles puede a menudo ser almacenado en frío durante horas a días antes de inseminarse, sin sufrir una disminución de las tasas

de preñez. Puede aumentarse la supervivencia espermática si se siguen los siguientes lineamientos:

1. Evaluar la calidad seminal inicial

Es importante contar con una buena calidad seminal inicial para tener éxito en el transporte de semen refrigerado. En un programa de transporte de semen refrigerado sólo se debe considerar el uso de sementales de fertilidad normal con semen fresco.

2. Diluir el semen con diluyentes de muy buena calidad

Los diluyentes de semen proveen ingredientes protectores que permiten la supervivencia de los espermatozoides fuera del tracto reproductivo. Las lipoproteínas contenidas en la leche y en la yema de huevo protegen al espermatozoide del shock por frío.

Los sustratos metabolizables como la glucosa, proveen una importante fuente de energía. Los antibióticos se añaden a los diluyentes para retardar o eliminar el crecimiento bacteriano.

Una comparación realizada entre los antibióticos comúnmente usados en los diluyentes de semen, demostró que una combinación de penicilina potásica y [sulfato de amicacina](#) mantuvo el mayor nivel de motilidad espermática, proveyendo además el mayor espectro de actividad antibacteriana.

Sin embargo, el o los antibióticos más apropiados para usar pueden variar entre sementales, dependiendo de la flora bacteriana en sus eyaculados y del efecto que los antibióticos pueden ejercer sobre la motilidad espermática después del enfriamiento y almacenamiento. El semen debe ser diluido con un diluyente entibiado a los pocos minutos de la eyaculación.

Los mejores resultados se obtienen cuando el semen se diluye por lo menos a una proporción 3:1 (v/v), diluyente: semen, hasta una dilución final de 25 - 50 x 10⁶ espermatozoides /ml antes del almacenamiento. Como alternativa se puede centrifugar el semen para reducir el plasma seminal a un 5 - 20% y resuspender en el diluyente.

3. Enfriamiento del semen diluido a la temperatura de refrigeración para el almacenamiento y transporte

El semen diluido debe retirarse rápidamente de la estufa para proceder al almacenamiento porque en pocas horas, a esa temperatura, se producirían extensos daños a los espermatozoides. Tanto la curva de enfriamiento como la temperatura de almacenamiento afectan la supervivencia espermática luego del almacenamiento. Una temperatura de almacenamiento de 4 - 6°C es preferible siempre que se logre con una curva de descenso relativamente lento.

Los estudios han demostrado que los espermatozoides son muy sensibles al enfriamiento rápido entre 20°C y 5°C. Los espermatozoides pueden ser enfriados rápidamente de 37°C a 20°C, pero de 20°C a 5°C van a requerir un descenso de -0,05°C a -0,1°C / minuto para maximizar la motilidad espermática. El tipo de recipiente utilizado para el transporte afecta la curva de enfriamiento y la temperatura de almacenamiento.⁵⁴

Factores que pueden influir en el grado de éxito obtenido con el uso de semen refrigerado transportado

Numerosos factores pueden influir en las tasas de preñez en yeguas servidas con semen equino enfriado. En experimentos controlados de laboratorio, los factores que influyen en la viabilidad del semen enfriado incluyen:

1. Número de espermatozoides inseminados
2. Frecuencia de inseminación
3. Concentración de los espermatozoides en el diluyente
4. Tipo de diluyente utilizado (incluyendo los antibióticos)
5. Curva de enfriamiento del semen diluido, el tiempo y la temperatura de almacenamiento antes de la inseminación
6. Respuesta de los espermatozoides al enfriamiento y la fertilidad inherente de la yegua y el semental.

Si la calidad de semen fresco es pobre o las tasas de preñez obtenidas con semen fresco son bajas es poco probable que la inseminación con semen enfriado sea exitosa.²⁰

Otros factores que indudablemente afectan la fertilidad con el uso de esta tecnología incluyen

1. La técnica de recolección de semen
2. El intervalo de tiempo entre recolección y dilución de semen
3. La técnica de envasado de semen
4. El intervalo de tiempo entre inseminación-ovulación
5. La técnica de inseminación.

Los espermatozoides son sensibles a muchos factores ambientales, incluyendo la temperatura, luz, trauma físico y una variedad de productos químicos. Es por eso que cualquier factor que afecte negativamente la capacidad de los espermatozoides para resistir el daño inducido por el ambiente, va a afectar en forma adversa la fertilidad cuando se insemina semen refrigerado transportado. ⁸⁸

Las tasas de preñez por ciclo obtenidas a partir de la inseminación con semen refrigerado a 5°C durante 24 h pueden ser del 60 - 70%, por lo tanto, se pueden esperar tasas prácticamente normales de preñez cuando se usa semen refrigerado y almacenado durante < 24 h siempre que la calidad del semen sea buena luego de ese período de enfriamiento. ⁵⁷

La inseminación con semen equino enfriado a 5°C durante 48 h generalmente reduce las tasas de preñez a la mitad de lo obtenido con semen fresco. ⁸³

BIBLIOGRAFIA

1. Acosta, T. J. y Miyamoto, A. (2004). Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. *Animal Reproduction Science*, 82-83, 127-140.
2. ARBEITER, K.; BARTH, U.; JOCHLE, W. Observations on the use of progesterone intravaginally and of desorelin in acyclic mares for induction of ovulations. *J. Eq. Vet. Sci.* 14(1): 21-25. 1994.
3. Arthur GH. Endogenous and exogenous control of ovarian cyclicity. In: Arthur's veterinary reproduction and obstetrics. (Noakes, D.E., Parkinson, T.J., England, J.C.W. editors), 8th edition. Saunders Harcourt Publishers, Elsevier Science Limited, pp. 3–51.
4. AUSTIN, CR. 1951. Observation on the penetration of the sperm into the
5. Biotecnología de la Reproducción (ed. Palma G). Ed. INTA. Balcarce. Argentina. p. 1-14
6. Blanchard TL, Taylor TS, Love CL. Estrous cycle characteristics and response to estrus synchronization in mammoth asses (*Equus asinus americanus*). *Theriogenology* 1999; 52: 827-834.
7. BURNS, P.J.; BALL, B.A.; TICE, R.T.; MASON, D.W.; LOVE, D.F. A preliminary report on the efficiency of biodegradable microspheres for the controlled release of progesterone and estradiol for synchronization of ovulation in mares. *Theriogenol* 33(1):202 (Abstr.). 1990.
8. CABODEVILA, J. 2001. Programa de transferencia de embriones. En CABODEVILA, J. y TERUEL, M. 2001. Criopreservación de embriones bovinos. En Biotecnología de la Reproducción (ed. Palma, G.) Ed. INTA. Balcarce. Argentina. p. 149-167
9. CALLEJAS, S. 2001. Fisiología del ciclo estral. En Biotecnología de la 5 – 11 Biotempo 2005, Volumen 5, Reproducción. (Ed. Palma, G.) Ed. INTA. Balcarce. Argentina. p. 37-53
10. Carluccio A, Panzani S, Tosi U, Riccaboni P, Contri A, Veronesi MC. 2008. Morphological features of the placenta at term in the Martina Franca donkey. *Theriogenology* 2008; 69(8):918-24.

11. Carnevale, E. M. (2008). The mare model for follicular maturation and reproductive aging in the woman. *Theriogenology*, 69, 23-30.
12. CHANG, MC. 1951. The fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the Fallopian tubes. *Nature* 168: 697-698
13. Cuervo-Arango, J. y Newcombe, J. R. (2008). Repeatability of preovulatory follicular diameter and uterine edema pattern in two consecutive cycles in the mare and how they are influenced by ovulation inductors. *Theriogenology*, 69, 681-687.
14. DAVIES, M.C.G. Equine reproductive physiology, breeding and stud management. 2nd. Ed., Institute of Rural Studies, University of Wales, Aberystwyth, UK, 384pp. 2002.
15. Derar RI, Hussein HA. Ovarian Follicular Dynamics during the Estrous Cycle in jennies in Upper Egypt. SAGE Hindawi Access to Research. Veterinary Medicine International, 2011, 6.
16. Dinger, J. E. y Noiles, E. E. (1984). Ovarian activity in synchronized mares following administration of follicle stimulating hormone. *Animal Reproduction Science*, 7, 511-516.
17. DINGER, J.E.; NOILES, E.E.; BATES, M.J.L. Effect of progesterone impregnated vaginal sponges and PMSG administration on oestrous synchronization in mares.
18. DRIANCOURT, M.A.; PALMER, E. Seasonal and individual effects on ovarian and endocrine responses of mares to a synchronization treatment with progestagen impregnated vaginal sponges. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 32:283-291. 1982.
19. Fernando Andrade Souza / Jair Pérez Osorio / Abisai D'Oliveira-Sousa / Vicente Ribeiro do Vale Filho / Henry Marc / Liliana Chacón J. / Sergio A. Arias Mihm, M. y Bleach, E. C. L. (2003). Endocrine regulation of ovarian antral follicle development in cattle. *Animal Reproduction Science*, 78, 217-237.
20. FOOTE, RH. 2002. The history of artificial insemination: selected notes and notables. *Am Soc Anim Sci*, 1-10.
21. Fortune, J E. (2003). The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Animal Reproduction Science*, 78 (3-4), 135-163.

22. Fortune, J. E., Rivers, G. M. y Yang, M. Y. (2004). Follicular development: The role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Animal Reproduction Science*, 82-83, 109-126.
23. Galisteo J, PerezMarin CC. Factors affecting gestation length and estrus cycle characteristics in Spanish donkey breeds reared in southern Spain. *Theriogenology* 2010; 74(3): 443-50.
24. Gastal, E. L. (1999). Selection of the dominant follicle in mares: role of follicle – diameter differences, gonadotropins, and estradiol. Thesis (Ph.D.), University of Wisconsin, Madison, WI, USA.
25. Ginther OJ, Scraba ST, Bergfelt DR. Reproductive seasonality of the jennies. *Theriogenology* 1987; 27: 587–592.
26. Ginther OJ. Reproductive biology of the mare. 2nd 480 ed. Cross Plains, Wisconsin: Equiservices, 1992.
27. Ginther, O. (1979). *Reproductive biology of mare. Basic and applied aspects. Equiservices, Cross Plains*. Wisconsin: Mc Maughton and Gunn.
28. Ginther, O. J. (2000). Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Animal Reproduction Science*, 60-61, 61-79.
29. Ginther, O. J. et al. (2005). Systemic concentrations of hormones during the development of follicular waves in mares and women: a comparative study. *Reproduction*, 130, 379-388.
30. Ginther, O. J., Beg, M. A., Donadeu, F. X. y Bergfelt, D. R. (2003). Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Animal Reproduction Science*, 78, 239-257.
31. Ginther, O. J., Gastal, E. L., Rodrigues, B. L., Gastal, M.O. y Beeg, M. A. (2008). Follicle diameters and hormone concentrations in the development of single versus double ovulations in mares. *Theriogenology*, 69, 583-590.
32. GINTHER, O.J. Reproductive Biology of the Mare. Basic and Applied Aspects. 2nd. Ed. 164 pp. 1992.
33. GONZALES-Figueroa, H. 1988. Análisis de la capacidad fértil del espermatozoide de cuy en función a la estabilidad territorial de la cauda del epidídimo. UNMSM. Tesis doctoral p.141
34. GONZALES-Figueroa, H. y GONZALES- Molfino, HM. 2005. Maturation of pig oocytes in vitro in a medium with pyruvate. *Braz J Med Biol Res*, 38 (6): 869-872.

35. Granger, A. L., Wyatt, W. E., Craig, W. N., Thompson, D. L. y Hembry, F. G. (1989). Effects of breed wintering diet on growth, puberty and plasma concentrations of growth hormone and insulin-like growth factor-1 in heifers. *Domestic Animal Endocrinology*, 6, 253-262.
36. Guillame D, Zarazaga LA, Malpoux B, Chemineau P. Variability of plasma melatonin level in pony mares (*Equus caballus*), comparison with the hybrid: mules and with jennies (*Equus asinus*). *Reprod. Nutr. Dev.* 2006; 46: 633-639.
37. Henry M, Figueiredo AEF, Palhares MS, Coryn M. Clinical and endocrine aspects of the oestrous cycle in donkeys (*Equus asinus*). *J. Reprod. Fertil.* 1987a; 35: 297-303, Suppl.
38. http://www.agrobiodiversity.net/topic_network/donkey/Donkey/Donkey-reportEN.pdf.
39. Hughes, J. P., Stabenfeldt, G. H. y Evans, J. W. (1972). Estrous cycle and ovulation in the mare. *Journal American Veterinary Medical Association*, 161, 1367-1374.
40. Hughes, J. P., Stabenfeldt, G. H. y Evans, J. W. (1975). The oestrous cycle of the mare. *Journal of Reproduction Fertility, Supplement*, 23, 161-166.
41. HUNTER, RH. y GREVE, T. 1997. Are lower fertility bulls necessarily less fertile. Proposals concerning insemination procedures. *Anim Reprod Sci* 48, 113-121.
42. Iroig, J. M., Munoz, F., Piedrahita, J. y Quintero-Moreno, A. (2004). Prediction of the day of ovulation in mares through physiological parameters measured during estrous. *Revista Científica (en línea)*, 14, 1-8. Recuperado de <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/959/95911219008.pdf>.
43. JÖCHLE, W.; HAMM, D.; SIEME, H.; MERKT, H. Clinical experiences in anoestrous mares with EAZI Breed CIDR-B, an intravaginal progesterone delivering device, used in the transition phase and during the season. *Reprod. Dom. Anim.* 26: 183 (Abstr.). 1991.
44. Kebede H, Lemma A, Negussie H. Ultrasonographic studies on ovarian dynamics and associated estrus manifestations of jennies under controlled management, Ethiopia. *Trop. Anim. Health Prod.* 2012; 44(8): 1965-70.
45. King, S. S., Douglas, B. L., Roser, J. F., Silva, K. L. y Jones, K. L. (2010). Differential luteolytic function between the physiological breeding season, autumn transition and persistent winter cyclicity in the mare. *Animal Reproduction Science*, 117, 232-240.
46. Kugler W, Grunenfelder HP, Broxham E. Donkey breeds in Europe. Monitoring Institute for Rare Breeds and Seeds in Europe, Report 2007-2008.

47. LAGO, J.I.; CAMPS, F.; PETRUCCELLI, D.; PIAGGIO, J.; LAROCCA, C. Efecto del examen ecográfico repetido en yeguas Pura Sangre de Carrera y Cuarto de Milla durante los primeros 2 meses de gestación. III Simp. Int. de Rep. Anim. IRAC (Instituto de Reproducción Animal Córdoba), Córdoba, Argentina. 247pp 1999.
48. LEBAS, J.P.; DELETANG, F. Utilización de progesterona vía intravaginal para inducir el celo y la ovulación en las yeguas. 4to. Simp. Int. de Repr. Anim., IRAC (Instituto de Reproducción Animal Córdoba), Córdoba, Argentina. 3138Abstr.) 2001.
49. Lemma A, Schwartz HJ, Bekana M. Application of ultrasonography in the study of the reproductive system of tropical Jennies (species Equus asinus). Trop. Anim. Health and Prod. 2006; 38, 267–274.
50. LÖFSTEDT, R.M. The use of progesterone & estradiolin broodmares. Atlantic Veterinary College, Univ. Of Prince Edward Island, Canada. Note Jun 06 8pp. 2003.
51. LOY, R.G.; EVANS, M.J.; PEMSTEIN, R.; TAYLOR, T.B. Effects of injected ovarian steroids on reproductive patterns and performance in post-partum mares. Reprod. Fert. Suppl 32:199-204. 1982.
52. LOY, R.G.; PEMSTEIN, R.; O'CANNA, D.; DOUGLAS, R.H. Control of ovulation in cycling mares with ovarian steroids and prostaglandin. Theriogenol 15(2):191-200. 1981.
53. LOY, R.G.; SWANN, S.M. Effects of exogenous progesterone on reproductive phenomena in mares. J. Anim. Sci. 25: 821-825. 1966.
54. LÜBBECKE, M.; KLUG, E.; HOPPEN, H.X.O.; JÖCHLE, W. Attempts to synchronize estrus and ovulation in mares using progesterone (CIDR-B) and GnRH analog deslorelin. Reprod. Dom. Anim. 29:305-314. 1994.
55. Magee, C. et al. (2009). Biological and anatomical evidence for kisspeptin regulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis of estrous horses mares. *Endocrinology*, 150, 2813-282.
56. 50 Rev. Med. Vet.: Bogotá (Colombia) N° 22: 43-50, julio-diciembre del 2011
57. Malayer, J. R. y Spicer, L. J. (2004). Effect of insulin-like growth factors (IGFs), FSH, and leptin on IGF-binding-protein mRNA expression in bovine granulosa and theca cells: quantitative detection by real-time PCR. *Peptides*, 25, 2195-2203.

58. MCCUE, PM; LEMONS, SS; SQUIRES, EL; VANDERWALL, DK. Efficacy of Synovex-S® implants in suppression of estrus in the mare. *J. Eq. Vet. Sci* 17(6): 327-329. 1997.
59. MCKINNON, A.; PERRIAM, W.; LESCUN, T.; WALKER, J.; VASEY, J. Effect of a GnRH analogue (Ovuplant), hCG and dexamethasone on time to ovulation in cycling mares. *World Equine Vet Rev.* 2:3 1997.
60. Murdoch, W. J. y McDonnell, A. C. (2002). Roles of the ovarian surface epithelium in ovulation and Carcinogenesis. *Reproduction*, 123, 743-750.
61. Murdoch, W. J., Colgin, D. C. y Ellis, J. A. (1997). Role of tumor necrosis factor- α in the ovulatory mechanism of ewes. *Journal of Animal Science*, 75, 1601-1605.
62. Murdoch, W. J., Peterson, T. A., van Kirk, E. A., Vincent, D. L. e Inskip, E. K. (1989). Interactive roles of progesterone, prostaglandins, and collagenase in the ovulatory mechanism of the ewe. *Biology of Reproduction*, 35, 1187-1194.
63. NEWCOMBE, J.R. Field observations on the use of a progesterone releasing intravaginal device to induce estrus and ovulation in seasonally anestrous mares. *J. Eq. Vet. Sci.* 22(9): 378-382. 2002.
64. NEWCOMBE, J.R.; HANDLER, J.; KLUG, E.; MEYERS, P.J.; JÖCHLE, W. Treatment of transition phase mares with progesterone intravaginally and with deslorelin or HCG to assist ovulations. *J. Eq. Vet. Sci.* 22(2): 57-64. 2002.
65. NEWCOMBE, JR.; WILSON, MC. The use of progesterone releasing intravaginal devices to induce estrus and ovulation in anoestrus standard breed mares in Australia. *Eq. Prac.* 19(6):13-21. 1997.
66. opciones biotecnológicas En La ganadería de los países en desarrollo. En: *Biología Agrícola para Países en Desarrollo* ed. FAO p 37-53
67. PALMA, G. 2001. Recolección de embriones. En *Biología de la Reproducción* (ed. Palma G). Ed. INTA. Balcarce. Argentina. p.109-124.
68. PALMER, E. Recent attempts to improve synchronization of ovulation and to induce superovulation in the mare. *Equine Vet. J. Suppl.* 3:11-18. 1985.
69. permeability and istrelatin to the survival of frozen-thawed embryos. *Theriogenology* 21: 70-79.
70. Pugh DG. Donkey Reproduction. Proceedings of the Annual Convention of the AAEP 2002; 113 -114.

71. Purdy SR. Artificial Insemination for Miniature Donkeys. In: Veterinary Care of Donkeys, Matthews NS and Taylor TS. (Eds.) International Veterinary Information Service, Ithaca NY ([www. ivis. org](http://www.ivis.org)), 20-Apr-2005; A2924.0405.
72. RALL, W F. y FAHY, GM. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by *vitrification* *Nature* 313: 573- 575.
73. Rawlings, N. C., Evans, A. C. O., Honaramooz, A. y Bartlewski, P. M. (2003). Antral follicle growth and endocrine changes in prepubertal cattle, sheep and goats. *Animal Reproduction Science*, 78, 259-270.
74. RUTTEN, D.R.; CHAFFAUX, S.; VALON, M.; DELETANG, F.; DE HAAS, V. Progesterone therapy in mares with abnormal oestrous cycles. *Vet. Rec.* 119(6): 569-571. 1986.
75. SÁNCHEZ, A.; RUBILAR, J. y GATICA, R. 2002. Uso de la prueba hiposmótica en la evaluación de la fertilidad potencial de semen canino fresco y congelado. *Arch. med. vet.* 34 (1):131- 134.
76. SAVE foundation 2013. Added value of donkey breeds in Europe: Project report January 2013.
77. SCHIEWE, M.; RALL, WF.; STUART, LD. y WILDT, DE. 1991. Analysis of cryoprotectant, cooling rate and in situ dilution using conventional freezing or vitrification for cryopreserving sheep embryos. *Theriogenology*. 36: 279- 293.
78. SILVIA, P.J.; SQUIRES E.L.; NETT, T.M. Pituitary responsiveness of mares challenged with GnRH at various stages of the transition into the breeding season. *J. Anim. Sci.* 64(3): 790-796. 1987.
79. Singleton, WL. 2001. State of the art in artificial insemination of pigs in the United States. *Theriogenology* 56, 1305– 1310.
80. SQUIRES, E.L.; STEVENS, W.B.; MCGLOTHLIN, D.E.; PICKETT, B.W. Effect of an oral progestin on the estrous cycle and fertility of mares. *J Anim Sci.* 49(3):729-735. 1979.
81. Taberner E, Medrano A, Pena A, Rigau T, Miro J. Oestrus cycle characteristics and prediction of ovulation in Catalanian jennies. *Theriogenology* 2008; 70(9): 1489-97.

82. Tibary A, Sghiri A, Bakkoury M, Fite C. Reproductive patterns in donkeys. Proceedings of the 9th International Congress of World Equine Veterinary Association. Reprinted in IVIS with the permission of the Conference Organizers <http://www.ivis.org>.
83. VAN EERDENBURG, F.J.; LOEFFLER, H.S.; VAN VLIET, J.H.; 1996. Detection of oestrus in dairy cows: a new approach to an old problem. *Vet Q* 18, 52–54.
84. Vanderplassche GM, Wesson JA, Ginther OJ. Behavioral, follicular and gonadotropin changes during estrous cycle in donkeys. *Theriogenology* 1981; 16: 239-249.
85. VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L.; BRINSKO, S.P. Estrogens, oxytocin and ergotalkaloids. Uses in reproductive management of mares. *Proc. Am. Assoc. Equine. Pract.* 219-241 pp. 1988.
86. VERBERCKMOES, S.; VAN SOOM, A. y DE KRUIF, A. 2004. Intra-uterine Insemination in Farm Animals and Humans. *Reprod Dom Anim* 39, 195–204
87. Veronesi MC, Villani M, Wilsher S, Contri A, Carluccio A. 2010. A comparative stereological study of the term placenta in the donkey, pony and Thoroughbred. *Theriogenology* 2010; 74(4):627-31.
88. WATSON, P.F. 1990. Artificial insemination and the preservation of semen. In: Lamming GE (ed.), *Marshall's Physiology of Reproduction*. Churchill Livingstone, Edinburgh, p. 747–869.
89. WEBEL, S.K. Estrous control in horses with progestin. *J. AnimSciAbstr* 564, 385. 1975.
90. WEBEL, S.K.; SQUIRES, E.L. Control of the estrous cycle in mares with altrenogest. *J ReprodFertSuppl* 32: 193. 1982.