

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**UTILIZACIÓN DE DIFERENTES DILUYENTES EN EL
CONGELADO DEL SEMEN EQUINO**

POR

GILBERTO ANTONIO PINO PONCE

MONOGRAFIA

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL TITULO DE**

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**UTILIZACIÓN DE DIFERENTES DILUYENTES EN EL
CONGELADO DEL SEMEN EQUINO
MONOGRAFÍA**

POR

GILBERTO ANTONIO PINO PONCE

ASESOR PRINCIPAL


M.C. JOSÉ DE JESÚS QUEZADA AGUIRRE

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

**UTILIZACIÓN DE DIFERENTES DILUYENTES EN EL
CONGELADO DEL SEMEN EQUINO**

MONOGRAFÍA

POR

GILBERTO ANTONIO PINO PONCE

PRESIDENTE DEL JURADO


M.C. JOSÉ DE JESÚS QUEZADA AGUIRRE

**COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA
ANIMAL**


MVZ. ERNESTO MARTÍNEZ ARANDA

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

JUNIO DEL 2002

Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal

UAAAN - UJL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"
UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

PRESIDENTE DEL JURADO


M.C. JOSÉ DE JESÚS QUEZADA AGUIRRE

VOCAL

I.Z. JORGE HORACIO BORUNDA RAMOS

VOCAL

I.Z. HÉCTOR MANUEL ESTRADA FLORES

VOCAL SUPLENTE

M.V.Z. RODRIGO ISIDRO SIMÓN ALONSO

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	2
REVISIÓN DE LITERATURA	3
Generalidades	3
Colección del semen	4
<i>Propiedades del semen.</i>	5
Evaluación del semen	5
<i>Apariencia.</i>	6
<i>Motilidad.</i>	6
<i>Concentración.</i>	7
<i>Morfología.</i>	7
Congelamiento de semen	7
<i>Centrifugación del eyaculado.</i>	8
<i>Diluyentes de congelación.</i>	10
CONCLUSIONES	15
LITERATURA CITADA	16

DEDICATORIA

A MIS PADRES

Un eterno agradecimiento a mis padres el Sr. Jaime Javier Pino Espinosa y a la Sra. Esther María Ponce de Pino, que con su gran esfuerzo y sus inolvidables consejos supieron darme una incomparable herencia de la cual me siento orgulloso.

A MIS HERMANOS

Dedico también la presente a mis hermanos Julia Adriana, Manuel y Priscila que gracias a su apoyo y confianza lograron dar a mi persona un estímulo para salir adelante en mi carrera.

A MIS TÍAS

Por todo su cariño y apoyo que me brindaron al confiar en mí. Principalmente a mi tía Adriana Espinosa y Celmira Espinosa (†) e su memoria y por enseñarme que cada sacrificio tiene su recompensa.

A MIS AMIGOS

Por todos los momentos felices y tristes que hemos compartido, por toda su confianza y amistad incondicional, gracias por contar con ustedes.

Al M.V.Z. Horacio E. Samudio, MVZ Domingo A. Miranda, MVZ Alfredo Arauz, MVZ Manuel Torres, MVZ Carlos A. Morales, MVZ Gerardo Salinas , MVZ Carlos A. Toledo, MVZ Carlos De Andar y a todos mis amigos chiapanecos.

AGRADECIMIENTOS

Principalmente a Dios por haberme iluminado el camino por el cual culminé mis estudios

A la UAAAN-UL por permitir realizar uno de mis sueños, donde me forjé como profesionista.

Al Dr. José de Jesús Quezada Aguirre, IZ Jorge Borunda, IZ Héctor Estrada, MVZ Rodrigo Simón y al Dr. Ramón García por haberme apoyado a lo largo de toda mi carrera

A la familia Sicilia, a la familia Coronel, a la familia Lezcano y a todas aquellas personas que de alguna u otra manera me han ayudado para la culminación de mi carrera.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años diferentes asociaciones de registro de razas de caballo han utilizado cada vez más el método de inseminación artificial para la reproducción de los equinos, y muchas de estas, utilizan semen congelado.

En el proceso de congelación – descongelación de semen equino la pérdida de la viabilidad espermática es de aproximadamente 50 – 60%, por lo que se han realizado diversas investigaciones para mejorar las técnicas de colección de semen, en las cuales el objeto ha sido modificar algunos de los pasos del procedimiento, a fin de encontrar, no siempre de manera directa, una disminución en la merma de la viabilidad espermática al momento de la evaluación. A tal efecto, también se han realizado estudios sobre modificaciones en la centrifugación del eyaculado, en la osmolaridad del diluyente de congelado, en el tipo de envase, en la concentración espermática, en el ritmo de descenso de la temperatura de congelamiento, así como en los crioprotectores intracelulares y en los azúcares de los diluyentes

Recientemente han surgido investigaciones en las que se utilizan alternativas proteínicas dentro del diluyente en lugar de la yema de huevo, así pues, se ha utilizado albúmina sérica bovina, suero equino, suero bovino, proteína de soya, alcohol polivinílico, etc. Todos estos ingredientes han sido utilizados en el congelado de semen equino.

OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo es hacer una revisión de literatura, para evaluar cual es el diluyente que nos brinda mayor confiabilidad en el congelamiento de semen equino, utilizado para la inseminación artificial.

REVISIÓN DE LITERATURA

Generalidades

La reproducción en el ganado equino es un proceso estacional. El periodo más fértil en el hemisferio norte va de abril a octubre. Los potros nacen normalmente en primavera y verano, época en que el suministro de alimento y las condiciones medioambientales son óptimas para la yegua y su cría. Como la gestación de la yegua dura 11 meses la época de celos se solapa con la de partos (Ginther, 1979).

Existe una estrecha relación entre la duración del día y el periodo anovulatorio. La ovulación se minimiza o suprime en invierno y es máxima en verano. La primavera y el otoño son periodo de transición entre los anteriores (Ginther, 1979).

La duración del ciclo varía con la estación. Hughes *et al.*, 1972, estudiaron el ciclo en California. El ciclo duraba 3 semanas aproximadamente. A partir de noviembre su duración aumentaba hasta más de 30 días en diciembre, enero, y febrero y posteriormente decrecía de nuevo. La duración del celo era mínima en la estación sexual (7-8 día). No había una relación clara entre la estación y la duración del diestro (Hughes *et al.*, 1972).

La estación también tiene un efecto pronunciado en el rendimiento reproductivo del semental. Se ha demostrado una influencia estacional sobre el tiempo de reacción (intervalo entre el primer contacto visual y la cópula) y el tiempo de copulación. Se observó que la actividad sexual máxima (en el hemisferio norte) tenía lugar entre marzo y octubre (Pickett, 1979).

Durante la estación reproductiva las yeguas salen en celo cada 21 (18-24) días como media. El celo dura unos 5 (3-9) y la ovulación tiene lugar 24-48 horas antes del final del mismo. La fecundación tiene lugar en el oviducto y se puede producir hasta 30 horas después de la ovulación (Woods 1990). El transporte del óvulo desde el ovario al útero dura unos 3 días. La implantación del blastocito tiene lugar a los 2 meses de la fecundación. La gestación dura 11 meses(310-365). El primer celo posparto, también llamado celo del potro , tiene lugar a los 5-15 días del parto. Posteriormente comienza de nuevo el ciclo normal (Woods 1990).

El desarrollo completo de las funciones reproductivas, que recibe el nombre de pubertad, se completa a los 2 años aproximadamente en las yeguas y un poco antes en los caballos. La capacidad reproductiva puede agotarse alrededor del os 20 años. Para obrar con garantías de obtener una buena descendencia, los caballos no deben destinarse a la reproducción antes de los 3 años. La duración de la capacidad reproductiva de los sementales puede superar ligeramente los 20 años (Falsina, 1992)

Colección del semen

Las características y fertilidad de los espermatozoides pueden afectarse por las técnicas de recolección empleada. Se pueden utilizar una de las 4 técnicas básicas que son: manipulación digital o presión sobre el glande con una mano enguantada, electroeyaculación, utilización del condón y empleo de vagina artificial (Howard y Pace, 1991). Siendo este el más factible en la colección del semen equino (Zarco y Boeta, 2000).

Propiedades del semen.

El eyaculado del garañón está compuesto e 6 a 9 chorros. El volumen de cada chorro consecutivo en el eyaculado se reduce en aproximadamente 50% de valor inicial; el 70% o más de los espermatozoides y los constituyentes básicos están contenidos en las primeras tres eyaculaciones.

El material gelatinoso del semen secretado por las vesículas seminales tiene poco efecto en la motilidad o en la capacidad fecundadora de los espermatozoides. Algunas de las características más importantes del semen de garañón se resumen en el Cuadro 1 (Hernández, 1998).

Cuadro 1. Características generales del semen de garañón.

Volumen	<i>Variable entre individuos. promedio 40 a 150ml</i>
Aspecto	Fracción 1: acuosa; fracción 2: lechosa; fracción 3: viscosa
Color	Blanquecino
Motilidad	Promedio de 70%
Concentración	100 a 500 millones/ml
Morfología	90% de células normales
PH	7.0 a 7.8

(Hernández, 1998)

Evaluación del semen

En el laboratorio se retira el protector del recipiente del colector del semen y el filtro, se registra la presencia de alteraciones como sangre o pus. El pH del equino es ligeramente básico 7.2 a 7.7, esto se determina usando un potenciómetro en la primera hora después de la colección. Esto se realiza para

descartar cualquier tipo de contaminación con orina o jabón o puede asociarse también a lesiones inflamatorias del aparato genital interno (Zarco y Boeta, 2000).

La evaluación del semen debe realizarse lo más rápidamente posible después de su colección, ya que el líquido seminal altera las características móviles de los espermatozoides. Por esta razón algunos autores recomiendan adicionar al vaso colector de semen 50 a 100 ml de diluyente antes de la colección (Zarco y Boeta, 2000).

Apariencia.

El semen del caballo es normalmente blanco lechoso con un espesor equivalente a la nata simple. No debe haber evidencia de sangre. El volumen normal es de 30 a 250 ml, pero en promedio 100 ml. (Morel, 1993).

Motilidad.

La motilidad es clasificada de 0-5. 0 es clasificado como muy pobre y 5 como excelente. La motilidad debe ser evaluada inmediatamente (Morel, 1999).

Cuadro 2. Evaluación de la motilidad

<i>Grado</i>	<i>Descripción</i>
0	No hay motilidad
1	Estacionario o débil movimiento rotatorio
2	Mov. hacia delante y atrás pero menos del 50%. No hay olas
3	Olas rápidas que indica que hay de un 50 a 80% de motilidad
4	Mov. progresivo indicando que hay un 90% de motilidad
5	Movimientos con fuerza indicando un 100% de motilidad

(Morel, 1993)

Concentración.

La evaluación de la concentración espermática se realiza por medio de un hemacitómetro, utilizando una sustancia espermicida. Las concentraciones ideales para inseminar son de 300 a 500 millones/ml (Zarco y Boeta, 2000).

Morfología.

El examen de la morfología es un método que se realiza para evaluar la fertilidad del caballo. El espermatozoide se examina microscópicamente utilizando una muestra de semen diluido. Se considera que la morfología normal y apropiado de los espermatozoides para la inseminación artificial debe ser del 65% o más (Morel, 1993).

Congelamiento de semen

El congelado consiste en un descenso progresivo de la temperatura con el propósito de reducir la actividad fundamental espermática. (Payan, 1996)

El congelar semen equino presenta algunas desventajas que hay que tomar en cuenta ya que existe una pérdida de la motilidad espermática, logrando mantenerse de 40 a 45% de esta, además disminuye la fertilidad con respecto al semen fresco, y la membrana espermática pierde estabilidad al momento de la congelación y descongelación, aumentando el costo por concepción (Pérez, 1995).

Los resultados de la congelación del espermatozoide equino parecen ser satisfactorios; las tasas de concepción alcanzadas con inseminación son altas. Se menciona que en el semen congelado, el manejo debe ser rápido desde la colección de este hasta su congelación (no más de 20 minutos) aunque otros

citan que se debe de esperar que la muestra disminuya su temperatura (Zarco y Boeta, 1995).

Centrifugación del eyaculado.

Después de haber obtenido el semen deben ser eliminadas las secreciones accesorias por medio de la filtración y algunos autores aconsejan eliminar el plasma seminal por centrifugación. (Torres, 1995). Se recomienda que al momento de llegar al laboratorio para la conservación del semen, se mezcle con el diluyente de centrifugación, el cual debe estar a 37°C, dentro de los 2 minutos postcolección. Zarco y Boeta (1995) recomiendan que la dilución debe de ser 1:1 pero otros han utilizado diluciones de hasta 1:5 posteriormente se espera unos momentos para que haya el proceso de adaptación, que incluye en el descenso de la temperatura a la ambiental, para facilitar la sedimentación. La velocidad de centrifugación varía desde 400 gravedades/15minutos a 1000 gravedades/5 minutos. Con esto se logra separar el líquido seminal, que es la parte sobrenadante, ya que la presencia en el semen ocasiona que ocurra la aglutinación.

Torres (1995) menciona que existen 2 técnicas que desarrollan el diluyente de centrifugación, como se muestran en el cuadro 3 y 4.

Las concentraciones de plasma seminal muy altas y muy bajas fueron perjudiciales en la motilidad del espermatozoide; el 20% del semen fue la concentración óptima para la muestra; ya que el plasma seminal contiene electrolitos como lo es el caso de potasio (K), los cuales son importantes en la regulación de la función espermática (Torres, 1995).

Cuadro 3. Diluyente de centrifugación establecido por la escuela Norteamericana

<i>Ingrediente</i>	<i>Cantidad</i>
mOsm/kg	290
Citrato de sodio	25.950 g
Glucosa	1.500 g
EDTA disódico	3.699
Bicarbonato de sodio	1.200 g
pH	6.89

(Pérez, 1995)

Cuadro 4. Diluyente de centrifugación establecido por la escuela Alemana

<i>Aditivo</i>	<i>Cantidad</i>
Glucosa	59.985 g
Citrato de sodio	3.700 g
EDTA	3.699 g
Bicarbonato de sodio	1.200 g
Sulfato de polimixina B	10,000,000
Agua estilada c.b.p.	1litro
pH	6.59
mOsm/kg	409
Temperatura	36°C

(Pérez, 1995)

Diluyentes de congelación.

El diluyente debe prepararse poco antes de la colección del semen y enfriarse a 5°C. hasta el momento que se va a utilizar, el cual consta de:

- A. *Nutrientes*
- B. *Amortiguadores*
- C. *Antibacterianos*
- D. *Anticongelantes*

Torres, (1995) menciona que el diluyente que más se a utilizado y que mejores resultados ha dado es el sugerido por ellos, el cual se muestra en el cuadro siguiente.

Cuadro 5. Formulación para la elaboración del diluyente de congelación

<i>Ingrediente</i>	<i>Cantidad</i>
Diluyente de centrifugación	25ml
Lactosa al 11%	50ml
Glicerina	4ml
Yema de huevo	20ml
Pasta orvus	0.5ml
Agua destilada c.b.p.	100ml

Palacio y Zarco (1996) realizaron un estudio en donde colectaron 14 eyaculados equinos, de cada uno de ellos, previa centrifugación, se obtuvieron 7 alícuotas que fueron incorporadas a los diferentes diluyentes de congelación, cuya base general no difiere de ninguno de los tratamientos estudiados,

excepto en el componente proteínico, ya que en el grupo testigo se utilizó la yema de huevo al 20% (YH), la cual se sustituyó, en los grupos experimentales por suero equino al 3%, suero equino al 6%, albúmina sérica bovina al 2% y albúmina sérica al 3%. El proceso de congelamiento fue el mismo para todos los tratamientos y se utilizó el sistema PAS (Programa para análisis de semen) con el fin de evaluar la motilidad, velocidad y linealidad del recorrido de las muestras en pos descongelación. En general se notó un efecto detrimental considerable de todos los sustitutos al momento de la descongelación ya que solo el 46% de las muestras en estudio tuvieron viabilidad detectable por la computadora. En cambio todas las muestras testigo (YH) se pudieron analizar. En cuanto a la motilidad se encontró que el diluyente YH resultó ser el más. Además presentó mayor índice de velocidad y linealidad.

Palacio y Zarco (1996) concluyeron que el uso de yema de huevo en el diluyente de congelación de semen equino provee una mejor protección al espermatozoide ante dicho proceso, que los suero de equino, bovino y albúmina sérica bovina.

Cuadro 6. Diluyente con base en suero equino al 3% (SE3)

<i>Ingrediente</i>	<i>Cantidad</i>
Diluyente de centrifugación	25.00ml
Lactosa	7.48ml
Suero equino inactivado	3.00ml
Glicerol	4.00ml
Agua bidestilada	68.00ml

Cuadro 7. Diluyente con base en suero equino al 6% (SE6)

<i>Ingrediente</i>	<i>Cantidad</i>
Diluyente de centrifugación	25.00ml
Lactosa	7.15g
Suero equino inactivado	6.00ml
Glicerol	4.00ml
Agua bidestilada	65.00ml

Cuadro 8. Diluyente con base en suero bovino al 3% (SB3)

<i>Ingredientes</i>	<i>Cantidad</i>
Diluyente de centrifugación	25.00ml
lactosa	7.48g
Suero bovino inactivado	3.00ml
Glicerol	4.00ml
Agua bidestilada	68.00ml

Cuadro 9. Diluyente con base en suero bovino al 6% (SB6)

<i>Ingredientes</i>	<i>Cantidad</i>
Diluyente de centrifugación	25.00ml
lactosa	7.15g
Suero bovino	6.00ml
Glicerol	4.00ml
Agua bidestilada	65.00ml

Cuadro 10. Diluyente con base en albúmina sérica bovina al 2% (AS2)

<i>Ingredientes</i>	<i>Cantidad</i>
Diluyente de centrifugación	25.00ml
Lactosa	7.59g
Albúmina sérica bovina	2.00g
Glicerol	4.00ml
Agua bidestilada	68.00ml

Cuadro 11. Diluyente con base en albúmina sérica bovina al 3% (AS3)

<i>Ingredientes</i>	<i>Cantidad</i>
Diluyente de centrifugación	25.00ml
Lactosa	7.48g
Albúmina sérica bovina	3.00g
Glicerol	4.00ml
Agua bidestilada	68.00ml

Boeta y Zarco (2000) evaluaron la utilización de leche descremada ultra pasteurizada comercial como diluyente para semen de burro, destinado a la inseminación artificial de yeguas, comparándolo con el diluyente de Kenney. Se utilizaron 28 yeguas divididas en 2 grupos. Las yeguas del grupo testigo (n=11) fueron inseminadas con semen diluido en Kenney; las del grupo experimental (n=17) fueron inseminadas con semen diluido en leche descremada ultra pasteurizada. El índice de concepción fue de 54.5% para el grupo testigo y de

76.5% para el grupo inseminado con semen diluido en leche descremada ultra pasteurizada comercial.

Por otra parte Cortez *et al.*, en 1993, realizaron un estudio en el que compararon YH con un diluyente llamado Merck I en la que concluyeron que con un enfriamiento de 20 a 5°C a una velocidad de 0.1°C/min y con un tiempo de equilibrio en glicerol de 1 hora cumplía con los requisitos mínimos para utilizarse en la inseminación artificial de yeguas (30 % MP(motilidad)), por lo que se convierte en un alternativa para la criopreservación de semen en equinos genéticamente sobresalientes.

CONCLUSIONES

0018 : 3

Podemos concluir que el uso de la yema de huevo en el diluyente de congelación de semen equino provee una mejor protección al espermatozoide ante dicho proceso, que el suero equino, suero bovino y albúmina sérica bovina, ya que se notó un efecto detrimental considerable de todos los sustitutos al momento de la congelación ya que solo el 46% de las muestras tuvieron viabilidad detectable por la computadora. En cambio todas las muestras testigo (YH) se pudieron analizar. La motilidad no presentó diferencias entre los tratamientos, a excepción del diluyente SB6. En cuanto a la motilidad analizada visualmente, se encontró que el diluyente YH resultó ser de mayor motilidad. La linealidad resultó ser mejor para el diluyente YH y SB6. El mejor índice de velocidad lo presentó el diluyente YH.

Sin embargo los resultados de los estudios de la leche descremada ultra pasteurizada comercial sugieren que puede ser utilizada para la dilución de semen equino con resultados similares o mejores a los obtenidos con diluyentes químicamente definidos. La utilización de leche descremada ultra pasteurizada tiene considerables ventajas, ya que es muy barata en comparación con otros diluyentes, se puede obtener en cualquier lugar, se mantiene estéril hasta ser abierta, y no requiere de ninguna preparación.

LITERATURA CITADA

- Boeta, M. y Z. Luis. 2000. Utilización de leche descremada ultrapasteurizada como diluyente de semen refrigerado de burro destinado a la inseminación de yeguas: Disponible: <http://www.veterin.unam.mx/fmvzunam/cor31-1-a10.htm>. Acceso Enero 1, 2000.
- Cortez, C.J. *et al.*, 1998. diferentes Diluyentes y tiempo de Equilibrio en Glicerol en la Criopreservación de Semen Equino. XX Congreso anual AMMVEE. Zacatecas, México
- Falsina, G. 1992. Todo Sobre el Caballo. Editorial De Vecchi. Barcelona, España.
- Ginther O.J. 1979. Reproductive Biology of the Mare. Ann Arbor, Michigan. McNaughton and Gunn Inc.
- Hernández, S. 1998. Principales métodos de procesamiento de semen humano, equino y porcino. Boletín técnico, Univ. Autónoma de Chihuahua, Chihuahua.
- Howard, T.H., y M.M. Pace. 1991. Evaluación del semen e inseminación artificial. Page 40 en Fertilidad e Infertilidad en la Práctica Veterinaria. J. A. Laing., W.J. Brinley, and W.C. Wagner 4 ed. Interamericana McGraw-Hill. España.
- Hughes J. P., Stabenfeldt, G. H. y Evans, J. V. 1972. Clinical and endocrine aspects of the Oestrus cycle of the mare. Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners.
- Morel, D. 1993. Equine Reproductive Physiology, Breeding and Stud Management. CAB International. New York, NY.
- Morel, D. 1999. Equine Artificial Insemination. CAB International. New York, NY.
- Palacio, A. y L. Zarco. 1996. Efecto de la sustitución de yema de huevo por albúmina sérica bovina, suero equino o suero bovino en el diluyente de congelación sobre la viabilidad pos descongelación del espermatozoide equino. Rev. Veterinaria México. Vol. 27:221-227.
- Payan, O.E. 1996. Efecto de tres tipos de diluyentes sobre la calidad seminal de sementales bovinos. M. C. Tesis, Univ. Autónoma de Chihuahua, Chihuahua.

- Pérez, M. 1995. Uso y manejo del semen equino para inseminación artificial y sus diferencias en la técnica de congelado con el bovino y caprino. Boletín Técnico, Univ. Autónoma de Chihuahua, Chihuahua.
- Pickett, B. W., et al. 1979. Factor affecting the sexual behavior of the equine male. Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Equine practitioners. Miami Beach, Florida.
- Torres, J.F. 1995. Procesamiento y congelación de semen equino. Boletín Técnico, Univ. Autónoma de Chihuahua, Chihuahua.
- Zarco, L., y M. Boeta. 1995. Reproducción Equina. Academia de Investigación en Biología de la Reproducción, A.C. México.
- Zarco, L., y M. Boeta. 2000. Reproducción Equina. 2 edición. . Academia de Investigación en Biología de la Reproducción, A.C. México.
- Woods, J. et al. 1990. Effects of time of insemination relative to ovulation on pregnancy rate and embryonic-loss rate in mares. Equine Vet. J.