

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”**

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL



**“EXTRACCION, EVALUACION Y PROCESAMIENTO
DE SEMEN EQUINO”**

Por:

RODOLFO ANTONIO VICENTÉ CID DE LEÓN

MONOGRAFIA

**Presentada como Requisito Parcial para
Obtener el Título de:**

INGENIERO AGRONOMO ZOOTECNISTA

**Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
Marzo del 2006**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”**

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

**EXTRACCION, EVALUACION Y PROCESAMIENTO DE
SEMEN EQUINO**

Presentada por:

RODOLFO ANTONIO VICENTÉ CID DE LEÓN

MONOGRAFIA

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

INGENIERO AGRONOMO ZOOTECNISTA

Aprobado por:

Ing. José Rodolfo Peña Oranday
PRESIDENTE

Ing. Eduardo Ramos Galindo
SINODAL

Ing. Roberto A. Villaseñor Ramos
SINODAL

Q.F.B. Carmen Pérez Martínez

Dr. Ramón F. García Castillo
Coordinador de la división de ciencia animal

**Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
Marzo del 2006.**

DEDICATORIA

A mi padre el Sr. Sergio Antonio Vicenté Jiménez por alentarme, apoyarme y ser un ejemplo a seguir, forjándome a ser una persona mejor enseñándome los principios del respeto, la responsabilidad, la honorabilidad y por que siempre te he admirado, GRACIAS.

A mi madre la Sra. Mercedes M. Cid de León Peña por darme la vida, su amor incondicional, cariño y por cada uno de tus sacrificios, GRACIAS.

A mis hermanos Sergio Germán, Juan Carlos, Jashive Y Jonathan por brindare amor, comprensión y respeto. Los quiero mucho.

A mis primos Yohan, Iván, Jonathan, Karen y Nuria por haberme inspirado con buen ejemplo a terminar mi carrera y superarme.

A mi familia: abuelos (+), abuelas (+), tíos, tías, primos, primas por haber creído en mí y por compartir momentos de gran felicidad.

AGRADECIMIENTOS

A el Ing. José Rodolfo Peña Oranday, asesor principal en la elaboración de este trabajo y por ser un gran amigo en todos los momentos. Gracias.

A el Ing. Eduardo Ramos Galindo, por su contribución en la formulación, elaboración y finalización de este documento, gracias.

A el Ing. Roberto A. Villaseñor Ramos y a la Q.F.B. Carmen Pérez Martínez por su importante participación en el desarrollo y revisión de este trabajo.

Ing. Hernán Villatoro Moreno.

Ing. Juan Vicente Navarrete Mendoza

Ing. Antonio Navarrete Alfonso.

Ing. Desireé G. Jiménez Rodríguez

Lic. José Manuel Reyes Ávila

Ing. Luís Eder Hernández Vázquez.

Ing. Edwing Portillo Vega.

Ing. Enrique González Rojas

Ing. Paulina Vega Aquino

Ing. Francisco Zárate

A mi tía Silvia Carranza Reyes

Al Nano, al Oax, al Toño, la Basura, al Cetónico, la Paquita, a Francheke, Pau, al Gordo, al Payo, Chewaca, Pancho la burra, al gato, a Margarita, al Flavio y a todos aquellos que me acompañaron en los buenos y malos momentos.

A la Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro" por haberme cobijado y forjado como profesionista y una mejor persona. ¡Viva mi Alma Terra Mater! ¡Arriba los Buitres!

INDICE GENERAL

	Pagina
INDICE DE CUADROS.....	i
INDICE DE FIGURAS.....	ii
INTRODUCCION.....	1
Objetivo.....	3
REVISION DE LITERATURA.....	4
SELECCIÓN DEL REPRODUCTOR.....	4
PLASMA SEMINAL.....	6
ESPERMATOZOIDE.....	8
EXTRACCION Y COLECCIÓN DEL SEMEN.....	8
EVALUACION DEL SEMEN.....	21
Volumen.....	21
EVALUACION DEL EYACULADO.....	23
EVALUACION DEL EYACULADO.....	23
Apariencia.....	23
Motilidad.....	27
Concentración.....	31
Morfología.....	34
CALCULOS DE DILUCION.....	40
CARACTERISTICAS DEL DILUYENTE.....	40

DILUYENTES.....	43
ENFRIAMIENTO DEL SEMEN.....	44
CONGELACION DEL SEMEN.....	50
CONCLUSIONES.....	54
LITERATURA CITADA.....	55

INDICE DE CUADROS

	PAGINA
CUADRO 1. TINCION EOSINA-NIGROCINA.....	35
CUADRO 2. PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES NORMALES Y ANORMALES.....	39
CUADRO 3. DILUYENTE BERLINER.....	45
CUADRO 4. DILUYENTE KENNEY MODIFICADO PARA SEMEN DE CABALLO.....	47
CUADRO 5. DILUYENTE A BASE DE LECHE.....	48
CUADRO 6. DILUYENTE BAKEN 1 Y 2.....	48
CUADRO 7. DILUYENTE DE GELATINA Y CREMA.....	49
CUADRO 8. DILUYENTE KNOOP.....	50
CUADRO 9. DILUYENTE CITRATO DE SODIO-GLUCOSA.....	52

INDICE DE FIGURAS

	PAGINA
FIGURA 1. EJEMPLAR DE REPRODUCTOR.....	4
FIGURA 2. COLECCIÓN DE SEMEN POR EL METODO DE VAGINA ARTIFICIAL.....	9
FIGURA 3. VAGINA ARTIFICIAL BLANDA.....	12
FIGURA 4. VAGINA ARTIFICIAL RIGIDA “ MISSOURI”.....	12
FIGURA 5. MOVIMIENTO MASAL.....	27
FIGURA 6. ESPERMATOZOIDES NORMALES.....	34

Introducción

El desarrollo de la equinocultura en México se ha visto frenado debido a la poca información y la falta de investigación, que se realizan para este rubro. La falta de conocimientos para la explotación y los altos costos en la obtención de material genético para el desarrollo de la producción equina, la han dejado al margen, dando paso solo a la producción porcícola, avícola y de rumiantes como base de alimentación.

Entre las cualidades mas destacadas del caballo se encuentran que es irremplazable en algunas actividades del campo por motivos de orografía de terreno, también esta íntimamente relacionado con nuestra identidad y folklore sin tomar en cuenta la fuerza de trabajo, deportiva y de exposición, entre otras grandes características del caballo, son de importancia pecuaria para las labores del campo.

La realización de este trabajo tiene por objeto expresar algunas de las cualidades más importantes en la reproducción de ganado equino, además de otorgar información valiosa a estudiantes, profesores, investigadores y trabajadores del campo.

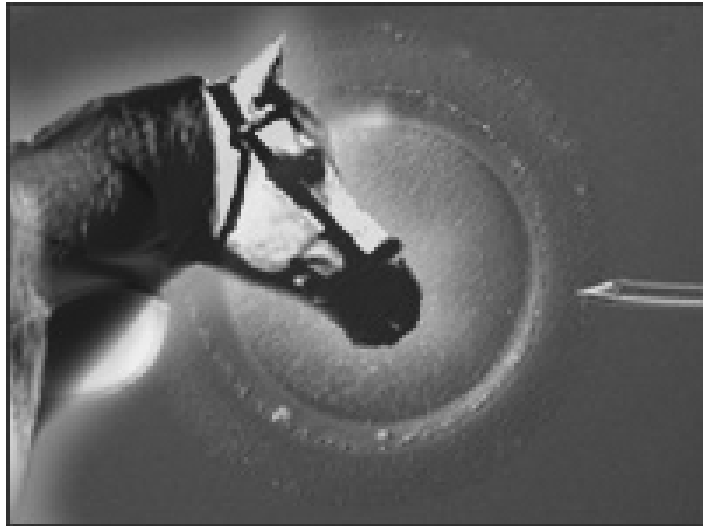
La importancia de aprender los métodos sobre el procesamiento de semen en equinos es de suma importancia ya que de esta forma

podemos obtener características genéticas de acuerdo a nuestras necesidades a las progenies y con la dilución de semen cubrir un número mayor de vientres, utilizando un solo eyaculado de un semental, el cual posea características genéticas de gran valor.

El procesamiento de semen, su conservación y almacenamiento es de gran trascendencia para el desarrollo de la equinocultura, pero para esto se necesita la aplicación de tecnología de punta, innovadora y de vanguardia, con la finalidad de incrementar el nivel genético de la producción equina. La conservación de semen "*In Vitro*" es una de las tecnologías a describir, de manera clara y explícita como manejar el material genético espermático, en base a estudios previos que se han realizado sobre el mismo y de esta manera puedan ser utilizados para optimizar las técnicas de reproducción ya establecidas.

Objetivo

- Proporcionar información objetiva y confiable acerca de la metodología del procesamiento del semen equino para su aplicación en los diferentes rubros de la producción.



REVISION DE LITERATURA

Selección del reproductor

Evans y Maxwell (1990) Mencionan que en la selección del semental se deben examinar los órganos reproductores poniendo especial atención en el tamaño y forma de los testículos y epidídimos, órganos que pueden ser palpados a través del escroto. Los testículos deben ser firmes y elásticos, carentes de lesiones o deformidades y moverse libremente dentro del saco escrotal, también inspeccionar anomalías en el prepucio, pene y conducto eyaculatorio.



Fig. 1 Ejemplar de reproductor.

<http://www.todosport.com.mx/atodo/galope346.phtml>

Mellado (1999) Propone que el estado de salud corporal del caballo debe ser evaluado. Se debe examinar que el animal se encuentre libre de malformaciones o lesiones crónicas, como cojera o lesiones dorsales, lo

que limitaría el desplazamiento y monte del caballo en el agostadero. La integridad de los dientes del animal también es importante porque una dentadura incompleta o desgastada afecta la habilidad del caballo para mantener una adecuada condición corporal. Se debe checar que el animal este libre de algunos defectos hereditarios como el criptorquidismo, microftalmia, prognatismo y el síndrome bamboleante.

Examen de los órganos genitales externos: El pene, el prepucio y la fosa uretral pueden examinarse cuando el pene y prepucio son lavados, en la preparación para la colección del semen. El escroto, testículos y epidídimo pueden revisarse en cualquier momento debiéndose revisar, la posición, tamaño, forma y consistencia de estos órganos. En el caso del escroto este debe ser delgado, elástico y con un cuello bien demarcado. Este órgano también debe estar libre de laceraciones, edemas, excoriaciones, inflamación y hemorragias. Los testículos deben tener una consistencia uniforme, con una textura ligeramente túrgida y flexible en todo el estroma. El tamaño de los testículos presenta una alta correlación con la producción diaria de espermatozoides, por lo que la medición de los testículos nos permite estimar la cantidad de la producción de células espermáticas. La medición de los testículos se lleva a cabo con un Vernier, luego de que los testículos son sujetados ventralmente. Si se requiere mayor exactitud las dimensiones testiculares pueden determinarse a través de exámenes ultrasonográficos transescrotales. Los testículos de un caballo fuerte y

maduro miden en un promedio de 8.5 a 11 cm. de longitud, y de 4.5 a 6 cm. de ancho. La anchura total escrotal considerando los 2 testículos es de 9.5 a 11.5 cm. Otra estructura que debe examinarse son los cordones espermáticos los cuales pueden palpase a través del cuello del escroto. Los cordones espermáticos deben ser de la misma longitud y diámetro (de 2 a 3 cm.). La piel del prepucio debe ser delgada y plegable, sin evidencia de lesiones inflamatorias ó proliferativas.

Examen de los órganos internos: Si se sospecha de anomalías es recomendable el examen de estos a través de la palpación rectal ó el uso de equipo de ultrasonido. Estos problemas son poco comunes.

Plasma seminal

Evans y Maxwell (1990) Mencionan que junto a la uretra y la unión de los conductos deferentes se encuentran un grupo de glándulas sexuales secundarias. Estas glándulas producen líquidos que se vierten en el tracto masculino y se mezclan con los espermatozoides formando así el semen. Estas glándulas sexuales accesorias son: las glándulas vesiculares, los epidídimos, los conductos deferentes y otras glándulas sexuales accesorias. El plasma seminal tiene tres funciones, actúa como activador de los espermatozoides ya que antes de entrar en contacto con el plasma seminal carecen de movimiento, actúa como vehículo para los espermatozoides transportándolos por el sistema

reproductor del macho durante la eyaculación, sirve como medio nutritivo que colabora con su supervivencia. El principal componente del plasma seminal son sustancias orgánicas e inorgánicas que sirven de protectores y nutrientes de los espermatozoides; el plasma seminal generalmente es un líquido isotónico y neutro.

Mellado (1999) Expresa que existe un material gelatinoso en el semen equino que proviene de las glándulas vesiculares, y que no tiene ningún efecto sobre la motilidad de los espermatozoides o de la congelación de estos. El material gelatinoso aparece en las últimas emisiones del semen y puede constituir un tercio del eyaculado.

Holy (1983) Por su parte menciona que la parte líquida del eyaculado "plasma" sirve como vehículo estimulante y diluyente de los espermatozoides proporcionándole la fuente de energía y protección, asegurándole así su supervivencia y fertilidad fuera del organismo. El plasma seminal forma una parte inseparable del eyaculado de la que depende la función y vida de las células espermáticas.

Salisbury y VanDermark (1964) proponen que en el plasma seminal se hallan varios aminoácidos y diversas proteínas complejas, varias vitaminas hidrosolubles, se han encontrado en el semen y, probablemente, existen en las células espermáticas. El semen eyaculado, es una combinación del producto de los testículos de la vía

genitales excretoras y de las secreciones de las glándulas accesorias, contiene espermatozoos y proporciones diversas de los líquidos y secreciones de las glándula que revisten el tracto reproductor masculino y de las que vacían su contenido en el.

Espermatozoide

Faustro (1956) Menciona que los espermatozoides se forman en el testículo en los canalículos seminíferos, el espermatozoide consta de cabeza, cuerpo y cola y están dotados de constante movimiento.

Evans y Maxwell (1990) mencionan que los espermatozoides son gametos masculinos que se producen en los túbulos seminíferos de los testículos. Los espermatozoides son gametos masculinos y cada célula espermática esta formada por dos partes principales que es cabeza y cola.

Holy (1983) expresa que los espermatozoides representan la parte principal del eyaculado transportando el material genético en forma de ácido desoxirribonucléico (ADN) como parte de información genética.

Pérez (1966) establece que desde el punto de vista estructural lo Espermatozoides están integrados por cabeza cuello y cola o flagelo de la cual se encuentra la porción caudal principal y el cilium terminal de la cola.

Extracción y recolección del semen

La colección del semen debe hacerse lo mas natural posible con la finalidad de que la muestra no se vea alterada en su calidad principalmente en relación a su concentración y volumen.

Bonadonna (1989) menciona que la vagina artificial es el medio mas adecuado para obtener semen en los equinos. Todos los otros métodos (esponja, recolección vaginal, colectores vaginales y electroeyaculadores) no siempre resultan lo suficientemente útiles.

El semen del garañón se recolecta para inseminación artificial o para valorar el semen, esta segunda parte es muy importante de realizar ya que podemos encontrar animales de alto valor genético pero estas características no podrán ser transmitidas.



Figura 2. Colección de semen por el método de la vagina artificial.
<http://www.equiworld.net/uk/horsecare/artificialinsemination/artificialinsemination.htm>

Mellado (1999) establece que antes de discutir la evaluación del semen es importante recordar que la integridad de los espermatozoides no se vea afectada por la presencia de oxígeno, cambios drásticos de temperatura, exposición a los rayos solares y a la agitación del eyaculado. Para la evaluación del semen también es necesario asegurarse que no existan porciones de gel en el eyaculado. Si este es el caso, entonces el gel debe extraerse con una jeringa.

Para el proceso de colección del semen, el prepucio y el glande de los caballos deben lavarse con agua tibia y jabón, particularmente en aquellos animales que no han sido utilizados por mucho tiempo. Lo anterior se hace debido a la acumulación de esmegma en el prepucio y en el glande del pene. Esta limpieza puede no necesitarse en caballos que recientemente hayan montado a las yeguas. En caso de que se tenga interés en detectar la presencia de bacterias patógenas en el pene del caballo, antes de la eyaculación se colectan muestras de estos organismos del glande y la uretra distal, con la ayuda de un hisopo de algodón, para llevar a cabo cultivos bacterianos posteriores.

Los tres modelos más comunes de vaginas artificiales para la colección de semen de caballos son: Colorado, Missouri y Japonesa. La vagina artificial se prepara antes del proceso de excitación del caballo, para lo cual se ensamblan las partes de látex y se llena con agua a 45-48°C el espacio entre la pared interna y externa de la vagina. Antes de

usar la vagina, la superficie interior de esta se lubrica con un gel que no dañe a los espermatozoides. El receptáculo para el semen debe mantenerse a la temperatura corporal durante la colección del semen y el transporte de este al laboratorio. Todos los componentes de la vagina artificial que entran en contacto con los espermatozoides no deben dañar a estos. Las partes re-usables de la vagina deben limpiarse adecuadamente, de tal forma que queden químicamente limpias, secas, y si es posible estériles.

Para desechar la fracción gelatinosa de semen se puede incorporar un filtro en la parte superior del receptáculo del semen.

Para el proceso de colección de semen se utiliza una yegua en celo o un domi. Si la colección de semen es muy frecuente el celo puede ser inducido en yeguas ovariectomizadas. A estas yeguas se les envuelve la cola y se procede a lavar la grupa y el área perineal. A la yegua se le debe de limitar los movimientos con ayuda de un arnés que sujete los corvejones de las patas traseras. Es importante que el caballo no lastime a la yegua o viceversa durante la copulación. Una vez que el caballo ha sido excitado, es decir tiene una erección, se permite que el caballo monte a la yegua tomándose de inmediato el pene del animal contra la vagina artificial y el caballo eyacule. Un signo claro de que la eyaculación ha ocurrido, es el temblor en las patas traseras del caballo y el meneo de su cola. Después de que el caballo desmonta, es conveniente tomar nuevamente muestras de flora microbiana de la uretra distal. El receptáculo conteniendo el semen es luego llevado al laboratorio para su observación.

Derivaux (1976) expresa que la recolección del espermatozoides constituye la primera operación que hay que realizar en la técnica de inseminación artificial. El método más comúnmente empleado y, prácticamente, en todas las especies animales, es el de la vagina artificial.



Fig. 3. Vagina artificial flexible o blanda.

<http://www.equiworld.net/uk/horseartificialinsemination.htm>

El principio de la vagina artificial, consiste en reunir en un aparato simple y práctico todas las condiciones naturales representadas por las vías genitales femeninas en el momento de coito y recoger rápidamente un eyaculado total y limpio. La forma y las dimensiones de la vagina artificial están en función de la especie para la cual ha sido prevista, teniendo en cuenta la conformación del pene y la talla del animal.

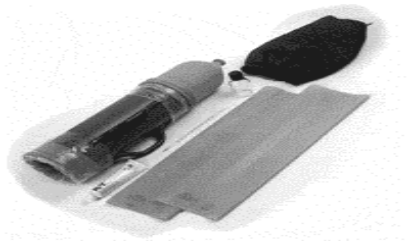


Fig. 4 Vagina artificial rígida "Missouri"

<http://www.equiworld.net/uk/horsecare/artificialinsemination.htm>

El tipo de vagina artificial utilizado en un semental equino es el mismo que el que se emplea en el toro, pero de mayor diámetro; el tubo colector esta reemplazado por un frasco cuya cabida esta en relación con el volumen del eyaculado de esta especie. Existen diferentes variantes, en particular el modelo ruso, el modelo americano "Missouri" y el francés de Laplaud.

El tipo "Missouri" consta de un cilindro exterior de caucho rígido, de 45 cm. de largo y 18 cm. de diámetro, e el interior del cual se encuentra un segundo cilindro blando, con las mismas dimensiones, pero de paredes delgadas, soldado por vulcanización a los extremos del cilindro exterior. El cilindro interior se continua en el extremo distal por una parte mas estrecha en cuya abertura de 2.5 cm. se adapta un frasco colector de 250 cc; la otro extremidad esta constituida por un anillo de goma de 5 cm. de ancho y 7.5 cm. de diámetro, que simula el esfínter uretral de la yegua y favorece la eyaculación del semental. Un pequeño orificio, situado en la porción estrecha del cilindro interior, permite la salida del aire a consecuencia de las presiones que ejerce el pene cuando entra a la vagina artificial. Dos asas sirven para la manipulación del aparato. Ciertas modificaciones han sido introducidas en este tipo de aparato las cuales tiene por objeto el conseguir que se aproximen al máximo las condiciones artificiales a las que se producen en un salto natural.

La detección del celo se hace por medio de valoración visual, por medio de la conducta propia del celo que se manifiesta, dejándose

montar por otra yegua, mucosidad en la vagina, palidez en la vagina, entre otras características.

La sincronización del estro involucra el control o manipulación del ciclo estral con el propósito de que las hembras elegidas expresen estro (celo) aproximadamente al mismo tiempo, pero en este caso, se necesita que presente estro la hembra para la obtención de semen en el momento de la monta.

La Prostaglandina $PGF_{2\alpha}$, hormona que en forma natural, es producida por el endometrio y actúa en el último período del ciclo causando la regresión del cuerpo lúteo y así reanudando el siguiente ciclo.

En el comercio esta hormona existe con diferentes nombres comerciales como: Lutalyse e Iliren, la base de su éxito consiste en la aplicación del producto en el momento que la hembra presenta cuerpo lúteo.

El semental se puede enseñar a montar sobre una yegua en celo, sobre una yegua normal o sobre un maniquí, pero en los dos primeros casos es esencial que la yegua sea lo mas dócil posible y para evitar cualquier accidente es mejor que sus miembros posteriores estén trabados. El semental generalmente acepta con gran facilidad la vagina artificial.

Bielansgi y col., que tienen una gran experiencia sobre esta materia, mencionan que solamente el 3.4% de los sementales rehúsan de una forma permanente la vagina artificial.

Estos problemas ocurren generalmente a consecuencia de haber realizado un trabajo sexual exagerado o por ciertos errores técnicos: temperatura o presión de la vagina artificial demasiado elevada o demasiado baja. La temperatura óptima se sitúa entre los 40-42 ° C pero no puede ser nunca inferior a 38° C.

La técnica de introducción del pene en la vagina artificial es en ángulo de 45°C. La presión alcanza el máximo en el mismo momento de la eyaculación, cuando el glande está completamente distendido. La eyaculación es percibida por el operador que mantiene el pene: cuando esta cesa, es decir, después de algunos minutos, la vagina artificial se baja y se retira mientras termina el salto. La presión manual ejercida sobre el pene ayuda a la eyaculación; si esta no ocurre, es necesario revisar las condiciones de temperatura y presión de la vagina artificial. Terminada la recolección el esperma se separa de la porción viscosa de origen vesicular y se mantiene al abrigo de contaminaciones bacterianas. Dos recolecciones, con un cuarto de hora de intervalo, pueden efectuarse durante una misma sesión.

Barrer y Rossdale (1977, 1991) proponen que para la extracción de semen los mejores métodos son la vagina artificial y el condón, obteniendo mejores resultados y permite la obtención de muestras menos contaminadas.

La vagina artificial consta básicamente de un cilindro rígido y poco pesado con un forro termo de goma, para llenar el espacio entre el forro y la estructura rígida se utiliza agua, (temperatura en el momento de la

recogida de 42 a 44°C), cuya presión se mantiene durante la recogida por medio de la vagina. En el extremo de la vagina se coloca una bolsa de goma de forma que el operador puede ejercer presión en el glande del pene. La presión sobre el glande y la temperatura del agua son dos factores principales que determinan la eyaculación.

La entrada de la vagina artificial se recubre con un lubricante estéril y en el otro extremo de la vagina se coloca un embudo recolector de goma.

Sorensen (1982), propone que desde hace muchos años el semen fresco del garañón se ha utilizado para inseminar yeguas previamente cubiertas por el macho o para dos o tres que entran en celo el mismo día. La disolución del esperma para almacenar en estado líquido prolongan su vida útil dos o tres días la congelación del semen elimina cualquier limitación respecto al tiempo.

La vagina artificial es mayor de tamaño para el garañón, que para las otras especies domésticas. El modelo más reconocido y manejable es el llamado Missouri que tiene una cubierta de cuero, con un revestimiento doble de pared y embudo moldeado que se ajusta al biberón regular de plástico. Tanto la temperatura como la presión son muy importantes, y con este modelo el operador puede ejercer presión necesaria durante la eyaculación. Otros constan tan solo de una funda para el agua, hecha de hule grueso y sin cubierta, mientras que algunas son demasiado rígidas como el modelo Pickett.

Cuando se utiliza vagina artificial, el garañón se conduce hasta donde se encuentra una yegua, a la que se le amarro la cola para evitar que le estorbe y se le excita dejando que se acerque, pero sin permitirles la monta. Se dispone de un par de cubetas con agua tibia y el pene del animal se lava con agua ligeramente jabonosa, luego del cual se lo enjuaga con cuidado y se le seca evitando la fricción y una posible eyaculación prematura. Luego se le permite al macho que se le acerque a la hembra por el flanco y que la corteje antes de montarla, ya que esto mejorara la calidad de la muestra. Cuando el garañón monta el operario se aproxima por el costado del animal, por detrás de los cuartos delanteros del garañón y dirige el pene erecto hacia la vagina artificial lubricada, para que el propio animal lo introduzca al desplazarse hacia delante, ya que el dispositivo se coloca justo al nivel y a un lado de la vulva es decir en un ángulo natural de penetración.

Cuando se utiliza un modelo flexible de vagina artificial, las manos del operario sienten el pene y pueden ejercer presión durante el servicio. Al apretar rítmicamente el pene, de acuerdo con las contracciones uretrales en cada empuje se estimula la eyaculación. Cuando el animal se desmonta de la vagina artificial se lava el pene.

Por lo general, se colecta la eyaculación completa con estos métodos la cual se cuele para quitar la porción gelatinosa. Lo anterior se hace con

una simple coladera hecha con varias capas de gasas y es posible realizarlo durante el proceso de recolección.

El garañón no siempre eyacula, y el promedio registrado va de 1.38 a 1.19 montas por eyaculación. Para estudiar el proceso eyaculatorio se utilizo una vagina artificial transparente. Antes de la eyaculación se ejecutaron de 7 a 15 empujes intravaginales para lograr la eyaculación.

También este mismo autor habla de otros métodos de recolección.

España: En este método se coloca una esponja en el interior de la vagina antes de la copula y, al retirarla después de la eyaculación se obtiene de ella una muestra. La esponja es una especie de tampón.

Vaso: se utiliza un vaso o cualquier recipiente adecuado para recoger el semen que escurre del pene del garañón, cuando este desmonta de la yegua. Por lo general esta muestra se encuentra muy diluida ya que la fracción concentrada se eyaculó antes que esta, compuesta sobre todo, por líquidos accesorios. En estos momentos el glande todavía esta dilatado y arrastra consigo una parte del semen depositado en la vagina, el cual se utiliza de la misma manera obtenido por succión.

Succión: Para hacerlo, se inserta en la vagina una pipeta unida a una perilla de succión y con ella se extrae el semen. Este ya se contamina con

los líquidos vaginales de la hembra, esta muestra no es satisfactoria para el análisis de evaluación.

Condón: Es posible recolectar la eyaculación del caballo mediante un condón que se acomoda sobre el glande en el momento en que el animal se dispone a montar a la yegua. Esta delgada bolsa de hule recibe el semen mismo que se recupera después de retirarlo cuando el garañón desmonta. Esta técnica precisa exige cierta experiencia en quien coloca el condón.

Dispositivo vaginal: Este recolector de semen es un dispositivo ahusado con una ceja en el extremo, que se coloca en el interior de la vagina antes de la copula. El macho eyacula en la porción craneal y el semen queda relativamente libre de contaminación. Las dificultades de este método superan sus ventajas y, por lo tanto, su demanda es muy poca. La inserción del dispositivo es difícil, algunos garañones no gustan de la sensación y el pene llega a meterlo en seco, esta última, a su vez llega a dañar el pene.

Electroeyaculador: No existen informes sobre electroeyaculadores de garañones. El autor intentó recolectar el semen de un mulo y la respuesta fue negativa la eyaculación constó de un líquido de color crema sin espermatozoides, no se sabe si los estaba produciendo o no.

La vagina artificial funcionó tan bien en los equinos que no se volvió a intentar dicho procedimiento.

CIRE (1993), propone que el uso de la vagina artificial es esencial para la colección de semen de alta calidad y es el método de colección preferido ya que los garañones no responden favorablemente a la electroeyaculación ya que la mayoría de estos pueden ser entrenados para utilizar la vagina artificial.

Merk (1993) expresa que para la recolección del semen se usa una yegua en estro, la yegua debe sujetarse del modo adecuado usando trabillas de servicio o acial, se debe envolver la cola y lavarse el área perineal de la hembra. Una vez que el semental logra una erección se debe lavar el pene a fondo con agua y jabón leve que no deje residuos. Si se usa jabón, el pene debe enjuagarse muy bien y secarse. Se toma entonces un cultivo de la uretra para bacterias patógenas, que se repite después de la eyaculación.

El método preferido de recolección de semen es usando la vagina artificial. Esto proporciona la muestra de semen más representativa. Los tipos de vagina artificial disponibles son Missouri, Colorado y Japonés.

La temperatura interna de la vagina artificial debe ser de 45 a 48°C, en el momento de la recolección. La vagina artificial debe lubricarse con un

gel lubricante estéril, no espermicida, justamente antes de la recolección. Se permite que el semental monte a la yegua y el pene se inserte en la vagina artificial. El semental comenzara a empujar y la eyaculación puede descubrirse por “meneo” de la cola y colocando la mano en el lado ventral del pene para sentir las pulsaciones uretrales que acompañan a la eyaculación. Después de la eyaculación, el semental desmonta y se obtiene el segundo cultivo uretral.

Se extrae el frasco de recolección de la vagina artificial y se coloca en un baño maría en incubadora (37 ° C), para mantener la viabilidad del semen si no se usa un filtro en el frasco de recolección en el momento de hacerlo el gel se aspira de la muestra tomando una jeringa antes de evaluar el semen. Todo el equipo usado para evaluar el semen debe mantenerse a 37 ° C, para evitar el choque térmico. Debe anotarse el volumen total del semen.

EVALUACIÓN DEL SEMEN

CIRE (1993) el semen obtenido de la recolección debe ser llevado inmediatamente al laboratorio, el eyaculado debe ser protegido de la luz del sol y del aire excesivo.

Volumen

Holy (1983) propone que el volumen se encuentra en estrecha relación con la edad, raza, alimentación, explotación, irritación sexual, tamaño de los testículos y periodos del año.

Evans y Maxwell (1990) expresan que el volumen no solo varia entre especies sino entre la misma especie independientemente de las variaciones individuales que existen, otros factores como la edad condiciones climáticas y estado nutricional.

Mellado (1999) propone que el volumen del eyaculado de un garañón se determina con un recipiente gradual. El gel del semen debe eliminarse durante la colección de este o inmediatamente después de su colección. El volumen que se registra, se refiere al semen libre de gel.

Derivaux (1976) expresa que la cantidad de esperma varia según la especie y, dentro de una misma especie, según el estado fisiológico del macho, el individuo, la raza, la edad, el tamaño, el número de saltos o de recogidas, los métodos de recolección, los factores higiénicos y alimentarios. Aunque un eyaculado de volumen normal sea ya un índice favorable, el volumen total del esperma recogido no es nada mas que un factor secundario de apreciación en las especies de inseminación de tipo uterino "caballo", el esperma es abundante y poco concentrado contrariamente de lo que sucede en especies de inseminación de tipo vaginal (rumiantes y roedores) en las que es poco abundante y muy concentrado.

El volumen total medio de un equino varia entre 75-150 cc (extremos 40 a 320 cc) se necesita de 10 a 30 cc de esperma no diluido para asegurar una inseminación.

Sorensen (1982), establece que el semen se evalúa para determinar la utilidad del semental o la de un eyaculado en particular. También se emplea para la evaluación, para anticipar el valor de un semental como pie de cría, bajo condiciones de pastoreo, monta controlada o inseminación artificial.

También el eyaculado se puede medir directamente del tubo de recogida si este está calibrado, o con más seguridad utilizando una pipeta calibrada; el volumen de cada eyaculado disminuye con la frecuencia de las recogidas dentro del mismo día o a lo largo de cada fecha, el número (cantidad) de espermatozoides por eyaculado depende del volumen y concentración del semen. Este mismo autor menciona que el garañón produce de 40 a 100 ml de semen diluido.

EVALUACIÓN DEL EYACULADO

Apariencia

Es una apreciación visual de la muestra de semen tan pronto, la cual deben observarse en tonalidades blancas con aspecto cremoso.

Evans y Maxwell (1990), proponen que el color del semen es el primer factor que se valora y debe hacerse en el mismo tubo de recogida, inmediatamente obtenido.

Sorensen (1982), menciona que el berraco y el garañón tienen eyaculados menos concentrados y se ven menos opacas que las del toro y carnero.

Algunas muestras presentan contaminantes y siempre debe procurarse que la obtención sea limpia si bien, es difícil evitar que el polvo y los pelos del vientre caigan en el aparato de recolección.

Es muy fácil distinguir la basura en las muestras de colores claros y si pasan de lo permitido no deben utilizarse con fines reproductivos, una forma de evitar este tipo de contaminación es limpiando el vientre.

Los animales enfermos suelen presentar glóbulos blancos o pus en el eyaculado, la presencia de leucocitos da al semen una apariencia grumosa y espesa, y este se pega a las paredes del tubo colector cuando se inclina.

La existencia de glóbulos rojos confiere al eyaculado un color rosado. Estas células pueden originarse por lesiones en el pene, así mismo pueden venir del tracto reproductor en si, la muestra puede utilizarse si el numero de eritrocitos no es muy elevado.

La presencia de orina en la prueba, ocasiona una coloración amarillenta y un color característico.

En ocasiones se encuentran en el eyaculado células epiteliales descamadas del prepucio y pene, si no son abundantes la muestra se puede utilizar para fines de reproducción.

Mellado (1999) expone que el semen fresco de caballo debe presentar una apariencia uniforme blanca opaco. Grumos en el eyaculado son signos de una infección en los órganos reproductivos del caballo, y estos pueden afectar la viabilidad de los espermatozoides. Los eyaculados de color amarillento rojizo están probablemente contaminados con orina o sangre, respectivamente. La contaminación con orina se detecta oliendo el eyaculado o bien midiendo el potencial osmótica de este.

Derivaux (1976), propone que el esperma del caballo es opaco, blanco-grisáceo y constituido por tres fracciones de valor similar:

Una primera de aspecto acuoso que solo contiene un escaso número de espermatozoides.

La segunda, clara, que contiene grandes masas de zoospermos.

Y la tercera, viscosa, que corresponde al producto de secreción de las vesículas seminales y las glándulas de Cowper.

El color del esperma puede ser modificado por la presencia de electos anormales:

a).- El color amarillo puede muchas veces ser debido a la presencia de pus o de orina en el esperma y, en estos casos, el poder fecundante se encuentran comprometidos y a veces completamente abolido.

b).- la coloración sonrosada o rojiza puede prevenir de la presencia de sangre fresca o presentarse después de una administración prolongada de fenotiazina.

c).- la coloración marrón testifica la presencia de elementos sanguíneos degenerados.

d).- la coloración blanquecina puede ser debida al hecho que existe una concentración escasa de espermatozoides.

e).- el esperma aumenta su opacidad en caso de ciertas degeneraciones testiculares, con el paso de células gigantes a través del epidídimo o en caso de inflamación de las vesículas seminales.

Motilidad

Merk (1993) expone la motilidad se calcula rápidamente después de la recolección, colocando una gota de semen en un portaobjetos tibio y evaluarlo microscópicamente. Las muestras concentradas pueden diluirse con un extensor de semen o una solución salina para evaluar motilidad.

Evans y Maxwell (1990) comentan que los espermatozoides pueden tener los siguientes tipos de movimientos:

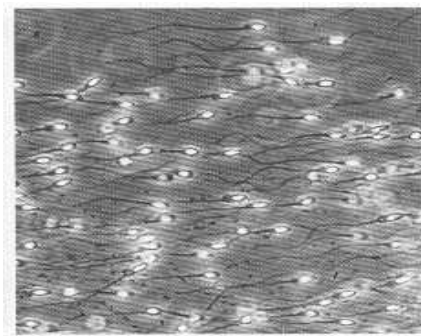


Fig. 5 Movimientos masal.

<http://www.equine-reproduction.com/articles/images/tank.jpg>

- Movimiento progresivo hacia adelante.
- Movimiento circular o rotatorio.
- Movimiento oscilatorio convulsivo sin progreso ni cambio de posición.

Se observan mediante el microscopio, con la ayuda de un portaobjetos, en una gota de semen se pueden ver las ondas de movimiento debidas a los movimientos de los espermatozoides en diferentes direcciones.

También este autor menciona que la motilidad se valora mediante la característica onda de movimiento del semen o según, la proporción de la motilidad progresiva de los espermatozoides en una muestra. La valoración por onda de movimiento es el sistema más simple para determinar motilidad en el semen fresco. Cuando el semen ha sido diluido extensivamente ó congelado y descongelado, se debe de utilizar la valoración mediante la proporción de espermatozoides progresivamente móviles.

Holy (1983) observa que en las muestras de semen vivo se valora el movimiento masivo de los nemaspermios y el tipo de movimiento individual, con el fin de establecer el porcentaje de nemaspermios vivos, lo cual es de extraordinaria importancia para la dilución final del semen y la fertilidad.

Sorensen (1982) establece que la motilidad esta expresada como el porcentaje de células vivas ó móviles. Dichas células pueden deslizarse en cualquier dirección y no importa la velocidad con la que lo hagan. La trayectoria del movimiento se incluye en la evaluación global de los aspectos morfológicos de las células, ya que las anormales no se desplazan hacia delante como el resto. Este autor utiliza el termino

“motilidad progresiva”, en el cual se incorporan la dirección y la tasa de células motiles, mientras que otros investigadores hacen una cuantificación independiente de la “tasa de movimiento de avance”.

Mellado (1999) menciona que la motilidad de los espermatozoides puede expresarse también, como la tasa de movimiento progresivo. En este caso solo se consideran aquellos espermatozoides que avanzan hacia delante y la velocidad de su desplazamiento.

Para esta determinación se utilizan una escala de 4 puntos, los cuales indican lo siguiente:

- 1.- Ningún movimiento progresivo (todos los espermatozoides muertos).
- 2.- Movimiento progresivo lento.
- 3.- Movimiento progresivo moderado.
- 4.- Movimiento progresivo acelerado.

La motilidad es una apreciación visual del porcentaje de células espermáticas que presentan movimiento, independiente de la dirección y velocidad de los espermatozoides. Para la determinación de la motilidad se coloca una gota de semen sobre un portaobjetos a una temperatura de 37°C. El semen se mezcla luego con una gota de diluyente de semen, o bien con una gota de solución salina (0.9% NaCl). Enseguida el semen diluido se cubre con un cubreobjetos y se observa al microscopio, a una

baja magnificación (100X). Con esta vista general de los espermatozoides se estima el porcentaje de espermatozoides que muestran movimiento.

Derivaux (1976) establece que el examen del esperma debe ser práctico y lo más inmediatamente posible de la recolección, a una temperatura próxima a la corporal, y es aconsejable, con el fin de evitar choques térmicos perjudiciales para los espermatozoides, recurrir al empleo de una platina que pueda calentarse de tal forma que la temperatura se mantenga constante durante todo el examen. Normalmente los espermatozoides se desplazan gracias a los movimientos de la cola al mismo tiempo que experimentan un movimiento de rotación alrededor de su eje longitudinal, de tal forma que, finalmente, su progresión es rectilínea.

El examen de la motilidad inicial permite apreciar la intensidad del movimiento de los espermatozoides por la existencia de verdaderas "olas" movimiento de flujo provocado por la reunión de los espermatozoides seguidos de su dispersión. Para la apreciación de esta motilidad masal el esperma se examina sin diluir y a un aumento pequeño. La existencia de estas olas es considerada como un índice de buena vitalidad de los gametos y de una buena concentración de espermatozoides. Sin embargo es mucho mejor, para una mayor precisión, recurrir a la apreciación de motilidad individual. Para realizar esto el esperma se diluye en suero fisiológico y se examina a grandes aumentos; los resultados se expresan numéricamente, porcentajes o en un escala del 1 al 5. Un esperma de

buena calidad debe poseer por lo menos 60-70 % de espermatozoides móviles con un grado de motilidad del 4 ó 5.

Concentración.

Merk (1993) expresa que la concentración puede medirse utilizando un hémocitometro o un espectrofotómetro, el número total de espermatozoides del eyaculado puede calcularse.

Sorensen (1982) menciona que es necesario determinar el número de espermatozoides por unidad de volumen, ya que esto nos permite conocer el número total de espermatozoides por eyaculado. Aunque se sabe que la relación entre la concentración y la fertilidad es baja, es un hecho que si no existen espermatozoides en el eyaculado, el macho es estéril; en cierta concentración, el animal es de dudosa fertilidad y en otras la fecundidad debe ser elevada. Es sobre esta la base que el parámetro se vuelve importante.

En los garañones existe un alto porcentaje (38%) del semen total en la recolección con vagina artificial debido a la adherencia de este al filtro (63%), a las partes de hule del dispositivo (22%) y al recipiente recolector (15%), es muy difícil corregir estas perdidas pero debe intentarse obtener el máximo de semen en cada muestreo. Los valores promedio por

eyaculado son de 109 ml compuestos por 68 ml de la fase gelatinosa y 41 ml. de la fase no gelatinosa la concentración es de 398 millones de espermatozoides por ml. Para un total de 17,000 millones de espermatozoides. Lo anterior resulta tomando en cuenta el eyaculado completo pero cuando se calcula el semen realmente disponible el número se reduce a 14 mil millones de cual es el utilizable, lo que resalta la necesidad de tener cuidados extremos durante la recolección y separación.

Se descubrió que los espermatozoides vivos resisten los colorantes supravitales, mientras que los muertos los absorben. Esta diferencia ofrece un método sencillo de conteo y, por lo tanto, de determinación del porcentaje de espermatozoides vivos de la muestra. Los colorantes de mas aceptación son estos dos: Eosina-nigrosina y Eosina-verde resistente FCF.

Mellado (1999) propone que se considera aceptable una concentración de 150 a 300 millones de espermatozoides por mililitro de semen.

La concentración de los espermatozoides se determina con la ayuda del hemocitómetro, espectrofotómetro o el densitómetro. De estos instrumentos el hemocitómetro es el menos costoso, aunque requiere de mayor tiempo y esfuerzo para estimar la concentración de las células espermáticas. Con espectrofotómetro calibrado a una longitud de onda de 525 um se determina la concentración en forma más rápida y directa.

Finalmente existen densitómetros diseñados específicamente para el conteo de espermatozoides de caballo.

También la concentración se puede determinar tiñendo los espermatozoides con tinciones que le permitan contrastar la coloración de las células espermáticas con un fondo oscuro.

Derivaux (1976) establece que la concentración expresa el número de espermatozoides por mm^3 ; este valor tiene gran importancia y es necesario conocerlo para juzgar la calidad del esperma. Se han empleado diversos métodos para investigarlo, especialmente: la numeración directa en la cámara cuenta glóbulos, la nefelometría y la espermio-densimetría.

Numeración directa: se realiza por medio de una dilución previa en un medio que a la vez produce una dispersión de los elementos, es capaz de matar a los espermatozoides: se puede emplear para esto, bien una solución de NaCl al 3%, o bien una solución de cloroceno al 1-4%. El grado de dilución depende de la riqueza aparente del esperma: se aconseja una dilución de 1/20 para el esperma del semental equino, una gota de esperma diluido se introduce en la cámara del hemocitómetro y se realiza la lectura.

El número de espermatozoides por unidad de volumen, varia considerablemente, según las especies animales, en el semental equino la media se sitúa entre 50 y 150,000 por ml cúbico.

Morfología

En esta prueba se determina las anormalidades primarias y secundarias de los espermatozoides mediante una tinción de contraste y observarla al microscopio determinando esta prueba en porcentaje.

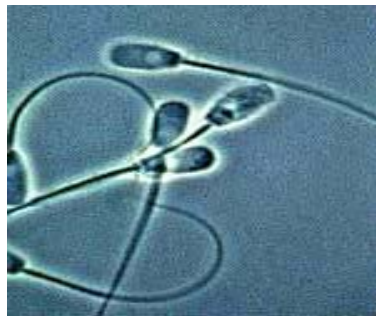


Figura 6. Espermatozoides normales.
<http://www.equine-reproduction.com/images/tank.jpg>

Evans y Maxwell (1990) comentan que el examen morfológico del semen es una prueba de control de calidad. Cada eyaculado contiene una serie de espermatozoides anormales, pero si la proporción de estos es muy alta entonces nos encontraremos ante un semen de baja calidad.

Los espermatozoides normales y anormales se pueden detectar en un frotis de semen teñido, preparados sobre un portaobjetos y sugiere utilizar la tinción Eosina-Nigrosina, colorante que tiene la siguiente composición:

Cuadro 1. Tinción eosina-nigrosina

Eosina (soluble en agua)	1.67g
Nigrosina (soluble en agua)	10.00g
Citrato de sodio 2H ₂ O	2.90g
Agua destilada, c.s.p.	100 ml

Los pasos para valorar la morfología de los espermatozoides en una muestra de semen, son los siguientes:

- A. Colocar, en lugares separados, 1-2 gotas de colorante y una pequeña gota de semen, sobre el extremo de un portaobjetos, templado a 37°C antes de mezclarlas dejar que las gotas alcancen la misma temperatura.
- B. Se mezclan el semen y el colorante, se extiende sobre el portaobjetos con la ayuda del borde de otro, de tal manera que se forme una delgada película sobre este. Si la película es muy gruesa el control será más difícil.

- C. Dejar que se seque la muestra y observar al microscopio con aumento grande (por lo menos 400X).
- D. Examinar, por lo menos, 100 espermatozoides en diferentes campos, cuantos mas espermatozoides se observen más aumenta la seguridad de la prueba. Anotar el número de espermatozoides normales y el de los distintos tipos de anormales.
- E. Las muestras de semen que contengan más del 15 % de espermatozoides anormales no se deben utilizar para Inseminación artificial.

Sorensen (1982) que la coloración de las muestras es de gran ayuda para diferenciar los diferentes tipos de células anormales bajo el microscopio.

Por lo general las anomalías se dividen en dos clases: las primarias y las secundarias.

Anormalidades Primarias: Estas son de origen testicular. Se piensa que ocurrió alguna falla durante el proceso espermatogénico y esta no se corrigió mientras el espermatozoide pasaba por el sistema de conductos.

Cabeza: los espermatozoides pueden presentar las siguientes irregularidades en la forma de la cabeza:

1. periforme o en forma de pera.
2. redondos.

3. alargados o estrechos.
4. microcefálicos o de cabeza pequeña.
5. macrocefálicos o de cabeza grande.
6. dobles o mellizos.
7. de acrosoma anormal.
8. Segmento intermedio
9. doblado o retorcido en ángulo recto
10. agrandado o hinchado
11. punto de inserción descentrado o abaxial

Cola

1. enrollada o rizada
2. doble

Anormalidades secundarias: Se supone que las anomalías secundarias aparecen durante el paso de los espermatozoides por el sistema de conductos, después de salir de los tubos seminíferos y el testículo en sí. Conviene hacer hincapié en que estas anomalías son de índole degradativa.

1. cabezas desprendidas
2. gota citoplásmica en el cuello o la cola
3. cola en gancho
4. cápsula desprendida de la cabeza

Por lo general, el desprendimiento de las cabezas ocurre durante la manipulación de la muestra y, por ello, no se le debe agitar con violencia. Asimismo, las cabezas suelen desprenderse al hacer un frotis para colorear la preparación.

La presencia de gotas citoplásmicas indica que el espermatozoide fue eyaculado antes de completar su maduración. Es probable que el macho este sobre utilizado y necesite un descanso.

Mellado (1999) considera un espermatozoide normal cuando este presenta una unión tesa media-cabeza axial o abaxial, ausencia de gotas citoplásmicas proximales o distales, pieza media y colas rectas y ausencia de defectos en la cabeza. Se considera aceptable el eyaculado cuando mas del 60% de los espermatozoides son morfológicamente normales. Las anomalías más comunes encontradas en un eyaculado típico de caballo se presentan en el siguiente cuadro.

Cuadro 2. Porcentaje de espermatozoides normales y anormales

Características	Porcentaje (Desviación estándar)
Espermatozoides normales	52 (18)
Cabezas anormales (forma anormal y acrosomas deformes)	8 (7)
Cabezas desprendidas	3 (4)
Gotas citoplásmicas proximales	11 (9)
Gotas citoplásmicas distales	8 (9)
Piezas medias anormales	8 (9)
Colas anormales	11 (9)

Derivaux (1976), propone que las causas de las anomalías morfológicas es la edad, la carencia de ciertos aminoácidos esenciales, la carencia de vitamina A, las estaciones del año, las influencias térmicas, el reposo sexual prolongado, ciertas enfermedades hereditarias, enfermedades microbianas en los testículos y glándulas ajenas, trastornos generales, la herencia, la insuficiencia tiroidea y una explotación y mantenimiento defectuoso.

CÁLCULOS DE DILUCIÓN

Tan pronto sea evaluada la muestra de semen y considerando los resultados obtenidos se procede a hacer cálculos de dilución de la siguiente manera:

a).- determinación del número de células o espermias vivos.

Células vivas = volumen X concentración X % de motilidad.

b).- Determinación del número de pajillas.

Número de pajillas = número de células vivas/cantidad de espermatozoides/dosis.

c).- Determinación de la proporción del diluyente.

Cantidad de diluyente = número de pajillas X volumen de pajilla.

CARACTERÍSTICAS DEL DILUYENTE

Derivaux (1976) expresa que la dilución permite aumentar la masa espermática, asegurar un medio favorable para la supervivencia de los espermatozoides in Vitro y realizar a partir de un solo eyaculado, la inseminación de un número elevado de hembras.

Los medios de dilución deben de responder a un cierto número de condiciones:

- a).- Presentar una presión osmótica lo mas isotónica con el esperma de la especie para la cual ha de ser utilizado y que sea capaz de mantenerla durante el tiempo de almacenamiento.

- b).- Contener sustancias taponadas que permitan mantener un pH favorable para lo espermatozoides.

- c).- Contener sustancias coloidales (yema de huevo, lipoproteínas ó lecitinas) capaces de proteger a los espermatozoides.

- d).- Poseer elementos que favorezcan el metabolismo, la vitalidad y la longevidad de los espermatozoides.

- e).- Estar libre de productos bacterianos y sustancias tóxicas que dañen el espermatozoide.

El diluyente debe mejorar el poder fecundante del esperma y mantenerlo a un nivel elevado durante el mayor tiempo posible; debe ser de fácil preparación y prestarse fácilmente a la esterilización, asepsia y finalmente económico.

Salisbury y Vandermark (1964) proponen que un diluyente debe cumplir con los siguientes requisitos.

- Proporcionar un equilibrio adecuado de elementos minerales esenciales para la vida de las células espermáticas.
- Aportar los nutrientes que precisan los zoospermos para su metabolismo aerobio y anaerobio.
- Suministrar lipoproteínas y/o lecitinas que protejan al espermatozoide del choque frío.
- Proveer sustancias químicas que tengan poder tampón sobre los productos finales del metabolismo citoespermática.
- Estar libres de sustancias, productos bacterianos o gérmenes infectivos que sean nocivos para los zoospermos, el aparato genital femenino, el proceso de fecundación y la implantación, así como el desarrollo del huevo fecundado.

Lewis (1986) propone que los espermatozoides se encuentran en el plasma seminal que suministra los nutrientes necesarios para mantener una elevada actividad metabólica necesaria para el proceso de transporte espermático a través del genital femenino. En el eyaculado, esta actividad metabólica solo puede mantenerse durante un periodo de

tiempo muy limitado, como es conocido desde los primeros estudios sobre la conservación del semen equino. Para poder conservar los espermatozoides durante periodos prolongados es necesario que se reduzca la actividad metabólica de los espermatozoides, mediante la dilución en un medio adecuado y la reducción de la temperatura.

DILUYENTES

Derivaux (1976) expresa que la conservación de un esperma se encuentra asegurada, por una parte, por la acción de sustancias nutritivas al medio y, por otra, por un descenso progresivo de la temperatura con el fin de reducir la actividad funcional espermática hasta un límite a partir del cual pueda ser reversible. La anabiosis u adormecimiento del esperma es necesaria para reducir los procesos catabólicos, es decir la utilización de materias nutritivas del medio y la formación de productos de desecho representados, en parte por ácido láctico. Esta anabiosis es realizada por la refrigeración y la conservación a bajas temperaturas.

Acartin (2001) Menciona que se han utilizado numerosos diluyentes para la preservación del semen equino, la mayoría se basa en leche o sus subproductos a los que se le añaden otros ingredientes químicos para ajustar el pH y la osmolaridad así como antibióticos para inhibir el crecimiento bacteriano.

En los últimos años el mercado de la leche ha evolucionado que es muy fácil encontrar leche descremada ultra pasteurizada que tiene la ventaja de que la lecitina a sido inactivada y no es necesario la adición de otro nutrimento, por lo que puede ser un diluyente sumamente practico.

ENFRIAMIENTO DEL SEMEN

Sorensen (1982) establece que desde hace muchos años, el semen fresco del garañón se ha utilizado para inseminara yeguas cubiertas por el macho o para dos o tres que entran en celo el mismo día. La dilución del semen para almacenarlo en estado liquido prolonga su vida útil a los tres días. La congelación del semen, elimina cualquier limitación respecto al tiempo.

Para una conservación de tiempo limitado existen distintos diluyentes entre los cuales se han recomendado los medios con yema de huevo, ya que son superiores a los que no la tienen, siendo también recomendable la adición de glucosa.

Acartin (2002) Otra posibilidad es diluir el semen con sustancias especiales (nutritivas) que permiten mantener el semen vivo bajo refrigeración a 5 °C por 48 a 72 horas, lo que permite transportarlo a la distancia que permita esas horas.

Derivaux (1976) expone que la leche contiene fosfatos, citratos, y azucares esenciales para la sobrevivencia de los espermatozoides.

Cuadro 3. Diluyente Berliner

Glucosa	5.70 g.
Tartrato sódico-potásico	0.67 g.
Yema de huevo fresca	315.00 g.
Gelatina	1.8 g.
Agua	100.00 ml.

Otro diluyente de esta clase esta compuesto de una parte de yema de huevo, cinco partes de una dilución al 1,3% de bicarbonato sódico y 5% de glucosa.

También encontramos el llamado diluyente Missouri que utiliza yema de huevo fosfatada, a la que se le adicionan 10 gr. de glucosa ó dextrosa por cada 100 cc de agua.

Mellado (1999) menciona que cuando se usa el semen fresco para la inseminación, este se colecta con una vagina artificial y posteriormente es concentrado, proceso que se logra al eliminar el plasma seminal después de la centrifugación del eyaculado. Lo anterior tiene que hacerse porque el plasma seminal en grandes cantidades es nocivo par el almacenamiento del semen de caballo, y a que proporciones de dilución altos (mayores de 1 parte de semen: 2 partes de diluyente) resultan en una

mejor motilidad y velocidad de los espermatozoides. La centrifugación puede evitarse si durante la colección del semen se logra separar las primeras 2 ó 3 emisiones de semen, lo cual se hace con el uso de una vagina abierta en el extremo donde se deposita el semen. En este último caso la centrifugación no es necesaria porque las primeras dos emisiones del eyaculado del caballo son generalmente muy densas y contiene aproximadamente el 50% de los espermatozoides. Con una tercera emisión se tienen alrededor del 75% de células espermáticas manteniéndose reducido el contenido de plasma seminal.

Para la centrifugación del semen se diluye en una proporción de 1:1 con el diluyente Kenney. El semen diluido es luego centrifugado a 700X g durante 3 minutos, resuspendiéndose posteriormente con el mismo diluyente, considerando para la dilución del semen que cada dosis de inseminación debe ser de 40 ml con una concentración de 500 millones de espermatozoides.

Si el semen desea almacenarse durante 24-48 horas, este debe enfriarse muy lentamente hasta llegar a los 5°C y conservarse a esta última temperatura. Se debe tener mucho cuidado en la velocidad del enfriamiento ya que con enfriamientos rápidos, los espermatozoides sufren de cambios irreversibles en sus membranas, lo que se llama el shock frío. La temperatura a la que los espermatozoides son susceptibles a este shock es a los 19 y 8 °C, para maximizar el número de células móviles

después del enfriamiento, el ritmo del enfriamiento debe de ser de 0.05° C/minuto entre los 20 y 5 ° C.

En caso de que se desee prolongar el tiempo de almacenamiento del semen, entonces se requiere utilizar el diluyente Kenney modificado, con el cual el semen puede almacenarse hasta por 80 horas a 5° C. En este último diluyente con el hepes se mantiene el pH durante el periodo de almacenamiento y la teofilina es un estimulante para la motilidad de los espermatozoides.

Cuadro 4. Diluyente Kenney modificado para semen de caballo.

Glucosa (g)	49
Leche en polvo descremada (g)	24
Teofilina (mM)	10
Hepes (mM)	10
Penicilina (UI)	1.5 x 10 ⁶
Estreptomicina (g)	1.5
Agua deionizada (ml)	1000

Antes de la inseminación el semen debe calentarse hasta que este alcance los 37° C, lo anterior se hace para prevenir posibles daños al útero con la infusión del semen a 5° C.

Cuadro 5. Diluyente a base de leche

Leche condensada comercial en un 60% de agua		Una parte
Glucosa	: 6,85 g.	
Tartrato sódico potasio	: 0,15 g.	Una parte
Ácido tártrico	: 0,008 g.	
Sulfanilamida	: 0,6 g.	
Agua	: 100g.	

Cuadro 6. Diluyente Baken 1 y 2

Agua destilada	:	100 cc
Cloruro potásico	:	0.025 g.
Fosfato ácido de sódico	:	0.05 g.

A 95 ml de esta solución añadir 5 gr. de glucosa y 2.5 cc de yema de huevo fresco, cabe mencionar que el Baken 1 necesita previamente ser centrifugado.

Cuadro 7. Diluyente de gelatina y crema.

Media Crema	88.7 ml
Gelatina	1.3 g
Agua destilada	10.0 ml
Penicilina	1000 unidades/ml
Deshidroestreptomicina	1 mg/ml
Polimixina B	200 unidades/ml

Caliente la crema a 95° C durante 2 a 4 minutos, ponga en el autoclave la gelatina diluida en 10 ml de agua, después mezcle la crema caliente con la gelatina y por ultimo enfríe e incorpore los antibióticos.

Uno de los diluyentes mas utilizados es la lactosa-yema (80 partes de lactosa al 11 % en agua tridestilada y 20 partes de yema de huevo, con el agregado de penicilina y estreptomicina).

Se utiliza una dosis de 500 millones de espermatozoides vivos y con motilidad progresiva. Eventualmente, ante una gran cascada de celos puede reducirse la dosis inseminante a un mínimo 100 millones tratando de evitar tan bajas en yeguas próximas a la ovulación. El volumen a utilizar por yegua puede variar entre 15 y 50 ml.

CONGELAMIENTO DEL SEMEN

Derivaux (1976) menciona que los resultados de la congelación del semen equino son satisfactorios. El semen debe tener las características adecuadas:

1. El espermatozoide equino para congelar debe tener una concentración suficiente de espermatozoides.
2. El grado de motilidad debe ser superior al 40% y el tanto por ciento de espermatozoides anormales, escaso.
3. El espermatozoide debe estar limpio y su pH comprendido entre 6.9 y 7.2

El mecanismo protector de la glicerina se basa sin duda, en varias circunstancias:

La glicerina suprime la fase peligrosa durante la cual los espermatozoides se encuentran en presencia de una solución salina demasiado concentrada; reduce el choque osmótico disminuyendo la concentración salina e impidiendo la salida del agua celular; dificulta la formación de hielo intracelular, pero conduce por el contrario, a la formación de masa vítrea solidificada. La glicerina puede igualmente participar en la actividad metabólica de la célula.

Cuadro 8. Diluyente de Knoop

Yema de huevo	:	20 ml.
Lactosa	:	3 g.
Levulosa	:	2.5 g.
Sorbitol	:	0.08 g.
Inositol	:	0.08 g.
Penicilina	:	50.000 U.
Estreptomicina	:	50.000 U por 100 ml de volumen.

Adicionar glicerina en la proporción de 5.6 a 5.8% y llevarla a un pH de 7.10.

Otro diluyente para congelación de semen es manejado de la siguiente forma:

Se filtra las sustancias coloidales luego se agrega el diluyente uno en proporción 7:3 el semen así diluido se centrifuga a 600 u 800 g durante 10 minutos, se descarga la fracción líquida, y como resultado, se obtienen 2 a 4 ml de espermatozoides concentrados. Estos se diluyen una vez más con un volumen igual al del diluyente 1; luego se incorpora una cantidad equivalente del diluyente 2. El semen diluido se coloca en ampollitas o pajillas antes de congelarlo a vapor. No necesita período de equilibramiento.

Samper (1995) la dosis inseminantes comerciales manejan un numero de 300 millones de espermatozoides totales por cada dosis, en pajillas de 0.5 ml y de 150 millones en pajillas de 0.25 ml.

Cuadro 9. Diluyente Citrato De Sodio-Glucosa

Primer diluyente		Segundo
diluyente		
Glucosa	5%	Primer
diluyente más		
Lactosa	.3 g	10% de
glucosa.		
Citrato de sodio	.3 g	
Fosfato de sodio	.05 g	
Tartrato de sodio-potasio	.05 g	
Yema de huevo	2.5-5.0 ml	
Penicilina	250/ml	
Estreptomicina	250 mg/ml	

Acartin (2002) Existe también la posibilidad de congelar el semen y mantenerlo en termos de nitrógeno líquido por toda una eternidad y así podríamos disponer del semen en el momento y lugar que queramos; sin

embargo, este procedimiento tiene sus limitantes. El semen equino una vez descongelado tiene una vida muy corta, por lo que requiere de un monitoreo minucioso de la yegua por ultrasonido, para predecir el momento óptimo de inseminación previo a la ovulación.

CONCLUSIONES

- Para la realización de este trabajo se recurrió a la recopilación de publicaciones, libros, revistas, paginas web, etc.
- El mejor método de obtención de semen equino es el de la vagina artificial, ya que en los otros métodos se obtuvieron resultados menos satisfactorios.
- El procesamiento de semen en si, congelado o fresco, nos brindan la posibilidad de inyectar material genético de alto valor, mejorando así las características buscadas para nuestros propósitos.
- El congelamiento de semen procesado equino es una biotécnica que nos favorece en su almacenamiento y conservación a través de muchos años, pero esta aun en periodo de experimentación.
- El enfriamiento de semen en equinos es una biotécnica mucho mas sencilla que la congelación del mismo pero nos limita en tiempo de almacenamiento y viabilidad del semen.
- En México esta tecnología se encuentra muy poco desarrollada y la existente esta solo al alcance de los productores solventes.

LITERATURA CITADA

- Bonadonna, T. 1986. Reproducción Animal e Inseminación Artificial. Tomo I. Primera edición. Ed. Hemisferio sur S. A.
- Bonadonna, T. 1989. Reproducción Animal e Inseminación Artificial. Tomo II. Primera edición. Ed. Hemisferio sur S. A.
- CIRE (Curso Internacional de Reproducción Equina) 1993. Inseminación Artificial en Equinos. UNAM. México D.F.
- Derivaux, J. 1976. Reproducción de los Animales Domésticos. 2ª Edición. Ed. Acriba, Zaragoza, España.
- Evans, G. y WMC. Maxwell. 1990. Inseminación Artificial de Ovejas y Cabras. Ed. Acriba, Zaragoza, España.
- Faustro, M. R. 1956. El Caballo. Sin Editorial. México, D.F.
- Kenney. R. M. 1984. Cycle and Pathologic Changes of the Mare Endometrium as Dectec by Biopsy, with a Nute on Early Embryonic Death. J. Amer. Vet. Med. Assoc. 387: 241-262
- Hafez, h. 1988. Reproducción de los Animales Domésticos. Ed. Limusa. México.
- Holy, L. 1983. Bases Biológicas de la Reproducción Bovina. Ed. Diana, México.

- http://www.acartin.com/manejo_de_la_yegua.htm
- <http://www.equiworld.net/uk/horsecare/artificialinsemination/artificialinsemination.htm>
- <http://www.todosport.com.mx/atodo/galope346.phtml>
- Mellado, B. M. 1999. Apuntes de Fisiología de la Reproducción.
- Merk & Co., Inc. 1993. Manual Merk de Veterinaria. Cuarta edición en español. Rahway, N. J., E.U.A.
- Pérez, P. F. 1966. Reproducción e Inseminación Artificial Ganadera. Ed. Científico Médica. España.
- Pickett, B. W. Faulnner, I. C. and Vos, J. L.I. 1975. Effect of Season Some Characteristics of Station Semen. In Equine Reproduction. I. W: Rowlands, W.R. Allen and P.D. Rossdale (Eds) Oxford, Blacwel Scientific Publication.
- Rossdale, P. 1991. Cría y Reproducción del Caballo. Ed. Acriba. Zaragoza, España.
- Salisbury, G. W., N. L. VanDermark. 1964. Fisiología de la Reproducción e inseminación Artificial de los Bóvidos. Ed. Acriba, Zaragoza, España.
- Warrer, E. 1970. El Caballo. Ed. Acriba. Zaragoza, España.