

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

**EFFECTOS DE LA CENTRIFUGACIÓN EN LA MOTILIDAD
ESPERMÁTICA DEL SEMEN EQUINO REFRIGERADO**

Cristina Saltos Jaramillo

Tesis de grado presentada como requisito para la
Obtención del título de Médico Veterinario

Quito
Enero 2007

Universidad San Francisco de Quito

Colegio de Ciencias de la Salud
Escuela de Medicina Veterinaria
HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

Efectos de la centrifugación en la motilidad espermática del semen equino refrigerado

Cristina Saltos Jaramillo

Dr. Enrique Cornejo
Director de la Tesis

Dra. Luz Granados
Miembro del tribunal de Tesis

Dr. Germán Romo
Miembro del tribunal de Tesis

Dr. Fernando Salas
Miembro del tribunal de Tesis

Dr. Ramiro Díaz
Miembro del tribunal de Tesis

Dr. Luís Donoso
Director del Programa de
Medicina Veterinaria USFQ

Quito, 22 de Enero 2007

© **Derechos de autor**
Maria Cristina Saltos Jaramillo
2007

DEDICATORIA

La vida me dio el honor de ser hija de un hombre muy especial, quien demostró su tenacidad, valor, entereza y fuerza, a lo largo del camino de su vida y lo plasmo al vencer al Guillain Barre.

Por ser siempre mi luz, mi guía, mi amigo y mí respaldo.

Con todo mi cariño y gratitud;

Para ti

Papa.

AGRADECIMIENTOS

Es de muy especial reconocimiento, la gran calidad profesional y humana del Dr. Enrique Cornejo, quien siendo mi director de tesis, ha sido además guía y tutor. Este trabajo contó también con la colaboración de la Dra. Gabriela Chávez, con quien realice el entrenamiento en trabajo y evaluación de laboratorio.

Finalmente, son pocas las palabras de gratitud, que podría plasmar comparando con el inmenso agradecimiento que siento por todo el apoyo y respaldo dado por mi familia, en especial a mi Padre, a lo largo de mi carrera universitaria.

Durante este recorrido, tuve el placer de conocer maestros, amigos y compañeros, quienes me impulsaron, ayudaron y compartieron, tanto las vivencias del aprendizaje de la Medicina Veterinaria así como los de la vida diaria.

No me queda más que un sincero;

Gracias.

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto que tienen diferentes fuerzas de centrifugación (Fg) y tiempos de centrifugación, sobre la motilidad espermática (MOT) del semen equino sometido a refrigeración por 24 horas.

Para este efecto se utilizaron dos caballos machos enteros, clínica y reproductivamente sanos, cuyas edades, condición, alimentación, historial de manejo y actitud del semen para soportar procesos de refrigeración fueran muy similares. Se realizaron 14 colectas de cada caballo las cuales fueron asignadas sucesivamente para cada tratamiento; Tratamiento # 1: sin centrifugación, Tratamiento # 2: 600 Fg x 5min, Tratamiento # 3: 600 Fg x 10min, Tratamiento # 4: 600 Fg x 15min, Tratamiento # 5: 1000 Fg x 5min, Tratamiento # 6: 1000 Fg x 10min, Tratamiento # 7: 1000 Fg x 15min.

Una vez eliminada la porción gelatinosa el semen, fue evaluado en sus características de motilidad, extendido 2:1 en E-Z mixín – “CST” equine semen extender, a continuación sometido a la combinación de Fg y tiempo de acuerdo al tratamiento respectivo, posteriormente se eliminó el 80% del plasma seminal, para luego resuspender el paquete espermático en el mismo extender, ser empacado en el Equitainer™ mantenido a temperatura ambiente y evaluado a las 24 horas.

Los resultados de este estudio indican que la Fg y el tiempo de centrifugación tienen una interacción, que la centrifugación a 1000 Fg tiene un efecto negativo en el mantenimiento de la MOT y que la combinación de 600 Fg por 15 min es la que presenta los mejores resultados en el manteniendo de la MOT post 24 horas de refrigeración.

ABSTRACT

The objective of this study was to determinate the effect that different gravity forces (Fg) and centrifugation times, have on equine spermatozoal motility after cooled and storage for 24 hours.

For this aim, two clinically healthy stallions, whose ages, condition, nutrition, management and semen aptitude to maintain spermatozoal motility after cooling and storage were similar, were used. There were made 14 semen collections for each horse, each one of these collections were designated in order for the 7 treatments (Treatment # 1: without centrifugation, Treatment # 2: 600 Fg for 5 min, Treatment # 3: 600 Fg for 10 min, Treatment # 4: 600 Fg for 15 min, Treatment # 5: 1000 Fg for 5 min, Treatment # 6: 600 Fg for 10 min, Treatment # 7: 600 Fg for 15 min).

Once the semen gel was eliminated, it was evaluated on its motions characterizes (MOT), extended 2:1 on E-Z mixín – “CST” equine semen extender, then centrifuged according to applied treatment, after that the 80% of the seminal plasma was eliminated, next the spermatozoal pellet was resuspended on the same extender, afterward the semen was packaged on the Equitainer™ , that was kept on room temperature for 24 hours to be finally evaluated.

The results of this study indicated that the Fg and time have a direct interaction, centrifugation at 1000 Fg has a negative effect on the MOT, and the combination of 600 Fg for 15 min presents the better results in maintaining the MOT after 24 hours of cooling.

TABLA DE CONTENIDO

- Introducción	1- 3
- Revisión de literatura	4 - 39
• Anatomía reproductiva de caballo	4-12
• Parámetros reproductivos del garañón	12-20
• Colección de semen	20-23
• Manejo de semen	23-25
• Evaluación de semen y esperma	25-33
• Transporte de semen equino refrigerado	33-39
- Metodología	40- 49
- Resultados	50- 53
- Discusión	54-55
- Conclusiones	56
- Recomendaciones	57
- Bibliografía	58-62

INTRODUCCIÓN

La refrigeración, almacenamiento y transporte de semen equino para una posterior inseminación en yeguas es cada vez más común en la industria equina (Dickson, 2003b). Existen muchas ventajas en la cría asistida con semen refrigerado entre las cuales se puede mencionar: la conveniencia de mantener la yegua en su lugar de residencia evitando el estrés provocado por el viaje, reduce

la probabilidad de transmisión de enfermedades venéreas, aumenta el reservorio genético al permitir el uso de un mayor número de sementales sin importar su distancia geográfica y finalmente permite la evaluación de la calidad y cantidad de espermatozoides utilizados en la inseminación (Brinsko *et al*, 2000b). Estas cualidades han estimulado el interés en esta tecnología entre los criadores de caballos quienes en el Ecuador cada vez más frecuentemente solicitan este servicio exigiendo de él calidad y eficiencia.

Desafortunadamente, la gran variación individual entre sementales en el mantenimiento de la motilidad espermática después de la refrigeración y almacenamiento da lugar a la disminución en la eficiencia de este proceso; no todos los sementales producen semen capaz de soportar los rigores de la refrigeración y transporte (Douglas- Hamilton *et al*, 2004).

El semen está compuesto de células espermáticas y plasma seminal. El plasma seminal en su mayoría contiene sustancias que benefician a los espermatozoides, sin embargo no es el medio ideal para refrigerar y almacenar espermatozoides (Picket *et al*, 2005). La identificación de los factores que reducen la motilidad en el plasma seminal es aún desconocida; sin embargo una fracción de alto peso molecular del plasma seminal ha mostrado reducir la motilidad en el semen de toro (Baas *et al*, 1998). Se podría especular que el plasma seminal del equino muestra las mismas consecuencias reductoras de motilidad espermática. Los efectos deteriorantes del plasma seminal pueden ser reducidos colectando y extendiendo solamente la fracción rica en espermatozoides del eyaculado del semen equino (conteniendo el 75% del esperma) (Varner *et al*, 2003). Desafortunadamente para los sementales cuyos eyaculados son oligospermicos,

ni el método mencionado anteriormente permite un número adecuado de espermatozoides móviles durante el transporte.

Otra de las formas de reducir las concentraciones de plasma seminal en el eyaculado es la centrifugación. El semen equino es rutinariamente sometido a la centrifugación previa la criopreservación para atenuar de esta manera los efectos adversos del plasma seminal (Douglas- Hamilton *et al*, 2004).

Estudios realizados por Jasko *et al* en 1991 y por Ferrer *et al* en el 2004 demostraron que las características de la motilidad espermática pueden ser mejoradas en el semen equino refrigerado gracias a la centrifugación y remoción del plasma seminal. Reportes de profesionales dedicados a la práctica privada de la reproducción equina señalan una mejora cuando la centrifugación es usada. No existen reportes publicados de estudios controlados del Ecuador (Comunicación personal- Dr. Enrique Cornejo, especialista en medicina y reproducción equina UNAM, profesor de medicina Universidad San Francisco de Quito).

Es por tanto la hipótesis de que mayores tiempos de centrifugación a mayor fuerza centrífuga (F_g) afectan la variación de la motilidad del semen equino sometido a refrigeración y almacenamiento por 24 horas.

Siendo el objetivo de este estudio probar el efecto de la centrifugación a 600 F_g y 1000 F_g por 5, 10 y 15 minutos, sobre la motilidad espermática del semen equino sometido a almacenamiento de 4 a 6 centígrados por 24 horas.

REVISIÓN DE LITERATURA

1. ANATOMÍA REPRODUCTIVA DEL CABALLO

La apreciación de una anatomía genital normal es esencial para un examen físico competente del tracto reproductivo del semental. El tracto genital del semental consiste en dos testículos, unidos a epidídimos, que están contenidos en el escroto; un par de conductos deferentes, que atraviesan junto con el cordón

espermático el abdomen caudal y terminan en la uretra pélvica; cuatro distintas glándulas genitales accesorias; un pene musculocavernoso con su prepucio para protección (Amann, 1998).

Escroto

El escroto del caballo, está situado en una posición elevada entre los miembros posteriores, es ligeramente penduloso y tiene una forma globular. La distintiva marca longitudinal en su línea ventral media está determinada por el rafe escrotal.

El rafe se encarga de dividir el escroto en dos compartimientos separados.

El escroto se encarga de revestir y proteger a los testículos, epidídimo, cordón espermático y músculo cremaster; también juega un papel vital en la termorregulación gonadal (Amann, 1998).

La pared del escroto está compuesta de cuatro capas: piel, túnica músculo dartos, fascia escrotal y la capa parietal de la túnica vaginal (desde fuera hacia adentro).

La piel escrotal es delgada y relativamente sin pelo y contiene numerosas glándulas sudoríparas y sebáceas (lo que provoca su textura oleosa y suave).

Directamente por debajo y adherida a la piel se encuentra la túnica músculo dartos. El músculo liso y tejido fibroelástico proveen al escroto sus propiedades contráctiles permitiéndole cambios en forma tamaño y posición. Y además la túnica dartos forma la separación media del escroto.

La fascia escrotal está interpuesta entre la túnica dartos y la túnica vaginal, siendo esta última la que contribuye considerablemente a impedir el movimiento del testículo dentro del escroto.

La capa parietal de la túnica vaginal es un saco membranoso que se continúa con el peritoneo parietal a nivel de los anillos vaginales. Esta capa aparece como una prolongación del peritoneo parietal durante el descenso de los testículos al escroto. Siendo esta capa parietal de la túnica vaginal ligeramente adherida a la fascia escrotal (Dickson, 2003a).

Testículos

El par de testículos se encuentran situados en el escroto, con su eje longitudinal dirigido horizontalmente.

Los testículos desarrollan funciones tanto endócrinas como exócrinas. Su rol exócrino es la espermatogénesis, mientras que la producción hormonal endócrina contribuye con otros factores importantes durante la espermatogénesis, diferenciación sexual, desarrollo de las características sexuales secundarias y la libido (Dickson, 2003a).

Los testículos están compuestos de parénquima testicular encapsulado por una gruesa y fibrosa túnica albugínea. Extensiones de la túnica albugínea penetran el parénquima testicular formando numerosos lóbulos. La túnica albugínea está compuesta de colágeno y fibras elásticas y una red de vasos sanguíneos. La porción más externa de la cápsula está íntimamente adherida a una membrana serosa, la capa visceral de la túnica albugínea.

La capa visceral y la parietal de la túnica albugínea están separadas por un estrecho espacio, llamado cavidad vaginal, que comunica directamente con la cavidad peritoneal. La cavidad vaginal normalmente contiene una pequeña

cantidad de fluido seroso que permite un limitado movimiento de los testículos y adjuntan los epidídimos dentro del saco de la túnica parietal vaginal (Amann, 2001).

Epidídimos

Cada epidídimo es un único ducto de características tortuosas que expandido puede llegar a medir de 70 a 80 metros en el garañón (Amann, 2001). Está formado de 13 a 15 ductos eferentes convergentes que terminan formando el conducto eferente.

El epidídimo anatómicamente está dividido en; cabeza, cuerpo y cola. La cabeza está adherida al polo craneal del testículo, el cuerpo cubre la superficie dorso lateral y la cola está adjunta al polo caudal del testículo, gracias al ligamento propio del testículo (Hafez, 2000).

El epidídimo no solamente sirve para conducir a los espermatozoides, si no que también absorbe fluidos hacia el lumen epididimal para concentrar los espermatozoides, proveyéndoles del medio ideal para madurar y alcanzar la capacidad fertilizante. Los espermatozoides que ingresan al epidídimo son incapaces de fertilizar, ellos adquieren esta capacidad únicamente después de su tránsito por el epidídimo (al menos por la cabeza y el cuerpo).

Los cambios específicos de maduración que ocurren en el epidídimo incluyen: capacitación para motilidad progresiva, modificaciones morfológicas (cambios ultraestructurales y bioquímicas en el plasma y membrana acrosomal, aumento en la estabilidad estructural de la cromatina nuclear) y cambios en el metabolismo espermático (Amann, 2001).

La cola del epidídimo sirve como un depósito de espermatozoides maduros. En caballos que se mantienen en un período de descanso sexual, la cola del epidídimo usualmente contiene sobre los cincuenta billones de espermatozoides, o mas del 60% de los reservorios extra gonadales (Amann, 1998). A pesar de que el porcentaje relativo de los espermatozoides contenidos la cola del epidídimo es similar tanto en caballos jóvenes (2 a 4 años) que en mayores (5 a 16 años), el número real de espermatozoides tiende a bajar en caballos mayores (Douglas – Hamilton, 2004).

Los espermatozoides que no son removidos del epidídimo por la eyaculación son emitidos intermitentemente hacia la uretra para ser eliminados por la micción. El tránsito espermático desde la cabeza hasta el segmento del cuerpo es un valor constante en todos los caballos y va de 4.0 a 4.1 días. Contracciones del peristaltismo epididimal y la velocidad del tránsito dentro de la cabeza y el cuerpo son aparentemente no afectadas por factores externos como la frecuencia de la eyaculación, la edad o la estación (Amann, 1998).

Prolongada retención espermática en la cola del epidídimo y conductos deferentes, tiende a provocar un marcado envejecimiento en los espermatozoides, presentando alteraciones morfológicas, así como una motilidad y capacidad fertilizante disminuida (Dickson, 2003 a).

Conducto Deferente

Los dos conductos deferentes sirven como un pasaje para los espermatozoides maduros, ya que conectan la cola del epidídimo con la porción pélvica de la

uretra. Este largo y altamente musculado conducto asciende a través de su cordón espermático respectivo, para emerger vía anillos vaginales en la cavidad abdominal. Para luego pasar caudalmente a través del peritoneo, entrar en la cavidad pélvica y terminar como unas pequeñas aberturas cerca de una pequeña protuberancia, el colículo seminal, situado en la superficie dorsal de la uretra pélvica (Dickson, 2003 a)

Cordón espermático

Los cordones espermáticos se extienden desde los anillos vaginales hacia el borde fijo del testículo correspondiente. Cada cordón espermático está cubierto por la capa parietal de la túnica vaginal. La capa parietal de esta túnica está conectada por el mesofuniculum al mesorquium o porción visceral de la túnica. El mesorquium se encuentra alrededor de todos los componentes del cordón, envolviendo la arteria testicular, las venas testiculares (Plexo pampiniforme), los vasos linfáticos, nervios, pequeñas fibras de músculo liso y un conducto deferente con sus vasos nutricios asociados (Dickson, 2003 a).

Glándulas genitales accesorias

El semen eyaculado está compuesto principalmente por las secreciones de las glándulas accesorias. Además de proveer un vehículo de transporte para los espermatozoides desde el macho al tracto reproductivo de la hembra durante el apareamiento, la función exacta de los productos secretados por estas glándulas aún permanecen oscuros (Dickson, 2003 a).

Las glándulas accesorias en el caballo incluyen: un par de glándulas ampulares, las glándulas vesicales o vesículas seminales, una glándula prostática bilobulada, un par de glándulas bulbouretrales y glándulas uretrales diseminadas (Hafez, 2000).

En el caballo se ha demostrado que en las glándulas accesorias ocurren cambios de volumen como resultado de la estimulación sexual (Thomas, 2001).

Las vesículas seminales se encuentran en posición lateral con respecto, a las posiciones terminales de cada conducto deferente, siendo grandes sacos glandulares piriformes. La fructosa y el ácido cítrico son componentes importantes de las secreciones de la vesícula seminal y siendo el equino el único que produce ácido cítrico (Hafez, 2000).

La próstata se extiende en sentido caudal hasta los conductos de las glándulas bulbouretrales, siendo en el caballo completamente externa y de apariencia bilobulada.

Las glándulas bulbouretrales se encuentran en posición dorsal a la uretra, cerca de la terminación de su parte pélvica (Springs- Mills, 1979).

En el caballo, los anillos vaginales, las ámpulas, los lóbulos de la próstata, pueden ser palpadas vía rectal. En el caso de la vesícula seminal está se hará palpable únicamente en casos de adenitis. Sin embargo todas las glándulas accesorias pueden ser identificadas por ultrasonografía transrectal (Dickson, 2003 a).

Uretra

La uretra es un canal membranoso que se extiende desde la vejiga a la porción distal del pene y sirve como un pasaje tanto para la orina como para el semen. La porción pélvica de la uretra está rodeada por una capa de tejido eréctil, el estrato cavernoso, el cual está envuelto por el grueso músculo uretral.

La porción extrapélvica o peniana de la uretra comienza en la base del pene donde este se une al arco isquiático, la uretra se extiende a lo largo del pene en la porción ventral del cuerpo cavernoso para terminar en el proceso uretral en la punta del pene (Nickel *et al*, 1993).

Pene

Este órgano copulatorio eréctil está bien desarrollado en los caballos. Este consiste en raíz (radix penis), cuerpo (copus penis) y glande.

La raíz del pene está adherida firmemente al arco isquiático gracias a dos fuertes ligamentos crurales (Nickel *et al*, 1993).

El pene del caballo es del tipo músculo cavernoso, debido a que el tejido eréctil está compuesto predominantemente de espacios cavernoso en lugar de travéculas de tejido fibroso (como en el caso del pene fibroelástico del toro).

El pene está compuesto de tres cuerpos cavernosos: el cuerpo cavernoso del pene, el cuerpo esponjoso, y el cuerpo esponjoso del glande. El cuerpo cavernoso del pene se extiende a todo lo largo del cuerpo del pene y está cubierto por la gruesa túnica albugínea (Dickson, 2003 a)

La erección precopulatoria del caballo, se debe principalmente a la acumulación de sangre, provocada por la dilatación de las arterias que irrigan los cuerpos cavernosos, causada por la excitación sexual (Hafez, 2000).

El cuerpo esponjoso del pene rodea la uretra peniana en toda su extensión. Este tejido es una extensión del estrato cavernoso alrededor de la uretra pélvica. El cuerpo esponjoso se ensancha en su terminación proximal en el arco isquiático. Como una extensión de los espacios cavernosos del cuerpo esponjoso del pene, se encuentra el cuerpo esponjoso del glande, localizado en el glande. Siendo este el tejido responsable de la gran expansión e hinchamiento del glande durante el coito (Nickel *et al*, 1993).

Prepucio

El prepucio cubre y protege el pene no erecto. A diferencia de otras especies el prepucio del caballo, se dobla alrededor del pene no erecto formando dos sacos distintivos; un prepucio externo y otro interno.

El prepucio externo consiste de una lámina interna y externa que convergen para originar el orificio prepucial. Únicamente la lámina externa del prepucio externo está expuesta cuando el pene no está extendido.

El prepucio externo del caballo es igual al de las otras especies domésticas; sin embargo su lámina interna no se adhiere directamente al pene del caballo, si no que continúa como el prepucio interno, que está compuesto también por una lámina interna y otra externa, que forman el anillo prepucial. El prepucio interno separa la cavidad prepucial en dos compartimientos separados (Dickson, 2003 a).

2. PARÁMETROS REPRODUCTIVOS EN EL GARAÑÓN

Madurez sexual

Los testículos se desarrollan embriológicamente en la porción retroperitoneal cerca del polo caudal de los riñones, luego atraviesan la cavidad abdominal junto a sus epidídimos, para descender a través del canal inguinal para alcanzar su posición final dentro del escroto en el período fetal tardío o ya sea durante la temprana fase post natal (Dickson, 2003 a).

Los testículos del caballo descienden al escroto entre la primera y la tercera semana de edad. En algunos casos dichos órganos ya se encuentran en el saco escrotal al nacimiento (Hafez, 2000).

El mecanismo que controla el descenso testicular no está completamente dilucidado, pero la producción de andrógenos estimulada por la gonadotropina de los testículos en crecimiento, juega un papel muy importante.

El paso de los testículos a través del canal no comienza si no hasta los 270 a 300 días de gestación, después de que los testículos reducen su tamaño. Los anillos vaginales se constriñen con rapidez después del nacimiento. Después de lo cual es muy improbable que los testículos abdominales vayan a descender a su posición escrotal. A pesar de ser considerado anormal, el descenso de los testículos inguinales al escroto ha sido observado en caballos de hasta 2 -3 años (Heys *et al*, 1995).

Su crecimiento post natal comienza en el mes 11 y el testículo izquierdo se desarrolla antes y crece más rápido que el derecho. En este momento hay

también un desarrollo gradual de los túbulos seminíferos hacia fuera, alrededor del testículo derecho (Hafez, 2000)

La edad a la cual los caballos se usan por primera vez para apareamiento natural o artificial está determinada principalmente por las condiciones de manejo. La edad en que los caballos alcanzan la pubertad varía de los 12 a los 24 meses; raza, estado nutricional y la estación de nacimiento pueden influenciar éste proceso (Dickson, 2003 a). Al tomar la eficiencia en la espermatogénesis como parámetro de madurez sexual los caballos alcanzan los niveles óptimos de producción de los 2.5 a 3 años, sin embargo la producción diaria de espermatozoides así como el peso testicular continúan su incremento hasta los 4 a 5 años (Jhonson *et al*, 2001).

Termorregulación de los testículos

Los testículos y epidídimos de los mamíferos domésticos requieren temperaturas inferiores a las corporales para lograr un óptimo funcionamiento.

La temperatura elevada en esta porción del tracto reproductivo disminuye la espermatogénesis así como la capacidad fertilizante de los espermatozoides. Las acciones combinadas del escroto, el plexo pampiniforme y el músculo cremaster regulan la temperatura gonadal (Dickson, 2003 a).

El escroto permite a los testículos y epidídimos asumir una posición fuera del cuerpo. La pared escrotal es delgada, con muy poca grasa, y contiene numerosas glándulas sudoríparas que ayudan a disminuir la temperatura gracias a la evaporación de la humedad. En adición el músculo túnica dartos en la pared del

escroto se relaja en clima caliente para producir un escroto más penduloso, para proveer una mayor área para enfriamiento por evaporación (Nickel *et al*, 1993).

El plexo pampiniforme está formado por la vena testicular que sale de cada testículo y luego se divide para formar muchos vasos intercomunicantes, que aleatoriamente se entrecruzan con la arteria testicular de gran calibre. La temperatura de la sangre en las ramas superficiales de la vena testicular es menor que la temperatura corporal, gracias a la pérdida de calor causada por la evaporación. La sangre venosa a menor temperatura ingresa al plexo pampiniforme, que actúa como un área de intercambio de calor. Mientras el plexo y la arteria testicular se entrecruzan, el calor es transferido desde la arteria testicular que lleva sangre a mayor temperatura hacia el plexo pampiniforme a menor temperatura, provocando una reducción de varios grados en la sangre que sale del área. Adicionalmente más calor puede perderse por el paso de la arteria testicular por la superficie del testículo (Dickson, 2003 a).

El músculo cremaster se puede contraer para elevar los testículos cerca del cuerpo, pero solo por cortos intervalos. Una completa relajación de los músculos permite a los testículos asumir una posición más distal en el escroto, que facilita el enfriamiento (Dickson, 2003 a).

Erección

La erección parece estar bajo el control parasimpático principalmente, mientras que la eyaculación es controlada por la porción simpático del sistema nervioso autónomo. La inervación somática del tracto reproductivo juega un papel de soporte en estos eventos.

El pene no erecto tiene una textura suave debido a su composición músculocarvernosa. Típicamente, está completamente retraído en el prepucio gracias al colapso de los espacios cavernosos sumado a la contracción de los músculos retractores del pene.

La excitación sexual desencadena una serie de eventos neuromusculares y hemodinámicos que transforman al pene en un órgano copulatorio rígido.

Dos diferentes ramas arteriales irrigan el tejido cavernoso del pene, este patrón vascular es diferente de cualquier otro animal doméstico, que usualmente poseen una arteria común para todos los cuerpos eréctiles (Níckel, 1993).

El cuerpo esponjoso del pene y su asociado cuerpo esponjoso del glande son irrigados por otro par de vasos, la arteria pudenda interna.

La musculatura extrínseca vital para la erección incluye los músculos; isquiocavernosos, retractores del pene, bulboesponjoso y uretrales.

Los músculos isquiocavernosos se extiende desde el isquium hasta la base del pene, mientras que el músculo bulboesponjoso se extiende a todo lo largo del pene terminando justo proximal al glande del pene (Bartels *et al*, 2004).

El músculo retractor del pene está compuesto de músculo liso y conecta el pene con las vértebras caudales, encargándose de mantener el pene no erecto dentro del prepucio.

El músculo uretral contribuye a los mecanismos de la erección como de la eyaculación. Una rama de este músculo cubre las glándulas bulbouretrales y ayudan a la expulsión del contenido luminal (Níckel, 1993).

La exposición de un macho a una yegua en celo, provoca la exteriorización de un pene flácido, gracias a la relajación del músculo retractor del pene. La

estimulación sexual continuada produce la relajación del músculo liso de las paredes y travéculas del cuerpo cavernoso del pene, vasodilatación de las arterias y contracciones rítmicas de los músculos isquiocavernosos. (Dickson, 2003 a).

Las contracciones de los músculos isquiocavernosos bombean sangre arterial dentro del cuerpo cavernoso del pene pero también presiona el dorso de la raíz del pene contra el isquium para ocluir el retorno venoso desde el cuerpo eréctil. Este sistema cerrado resulta en el establecimiento de una presión venosa local que excede por mucho la presión del sistema circulatorio (Bartels *et al*, 2004).

Espermatogénesis

La espermatogénesis es una serie de divisiones celulares y transformaciones dentro del testículo que resultan en la formación de espermatozoides. El proceso ocurre en la porción contorneada de los túbulos seminíferos, que constituyen más del 70 por ciento del parénquima testicular (Slusher, 1992).

La espermatogénesis puede ser dividida en tres fases: espermacitogénesis, meiosis y espermogénesis. Estas importantes pero diferentes funciones son realizadas en cada una de estas fases.

Durante la espermacitogénesis, las espermatogonias se dividen por mitosis, para producir otras espermatogonias para comenzar la proliferación para producir espermocitos primarios (Dickson, 2003 a)

El intercambio de material genético entre cromosomas homólogos de los espermocitos primarios durante la meiosis es seguida por la división que produce espermocitos secundarios. Los cuales inmediatamente se dividen para producir espermátidas haploides.

La espermogénesis ordena la diferenciación de las espermátidas con núcleo esférico a espermátidas maduras con núcleos elongados, y la liberación de las espermátidas como espermatozoarios (Varner *et al*, 1999)

Producción de semen

El eyaculado se compone de seis a nueve chorros resultantes las contracciones de la uretra. El volumen del eyaculado varía de 20 a 150 mililitros dependiendo de varios factores incluyendo la madurez del semental. Un semental promedio produce de 35000 a 70000 espermatozoides por segundo llegando a su pico de producción en la época de reproductiva, llegando a producir de tres a seis billones por día (Thomas, 2001). El volumen de cada chorro sucesivo se reduce alrededor del 50 % del valor inicial, 70% o mas de los espermatozoides y de los constituyentes bioquímicos básicos están contenido en los tres primeros chorros (Slusher, 1992).

El eyaculado puede ser dividido en cuatro fracciones de acuerdo a su composición, como se detalla en la Tabla #1 (Hafez, 2000).

Tabla # 1. *Características de las fracciones seminales del garañón. Hafez, 2000*

Fracción seminal	Origen	Características físicas
Pre-espermática	Glándulas uretrales	Acuosa
Rica en	Glándulas epididimarias	Lechosa, no viscosa

espermatozoides	y ampulares	
Post-espermática	Vesícula seminal	Muy viscosa
Goteo peneano	Muestra de la cola del extremo del epidídimo	acuosa

El material gelatinoso del semen, secretado por las vesículas seminales, carece de efecto sobre la motilidad o la capacidad fecundante del espermatozoide. El volumen de gel, que constituye alrededor de un tercio del eyaculado, varia considerablemente y no es característica del garañón individual (Slusher, 1992).

Las características del semen son influenciadas por el grado de estimulación sexual, frecuencia de eyaculación, edad, tamaño testicular y el método de colecta de semen.

La concentración de testosterona plasmática de los garañones también es influida por la época del año y es posible que module los patrones de las características seminales y de conducta (Slusher, 1992).

Eyaculación

La eyaculación consiste en una complicada actividad motora que se completa en dos fases: emisión de los espermatozoides y eyaculación del semen

- *Emisión de los espermatozoides:* Los espermatozoides del epidídimo y conducto deferente, así como las secreciones de las vesículas seminales y próstata, son trasportados al interior de la parte posterior de la uretra por la contracción activa de la

musculatura que rodea al epidídimo, conducto deferente y vesícula seminal. La emisión se relaciona con la contracción del esfínter interno de la uretra y cierre del cuello de la vejiga para impedir la expulsión de los espermatozoides de regreso a la vejiga.

- *La eyaculación de semen.* Esta fase es desencadenada por el transporte del semen en la parte prostática de la uretra. Los impulsos aferentes estimulan los nervios sacros y lumbares para que provoquen la contracción espasmódica de los músculos bulbocavernosos y perineales, el esfínter externo de la uretra se relaja y el semen es expelido a través de la uretra. El semen es eyaculado en varios impulsos vigorosos (Slusher, 1992).

Durante la eyaculación el divertículo uretral del pene está en estrecha aposición con el orificio cervical externo de la yegua. El semen por lo tanto es eyaculado a alta presión directamente al útero. Los chorros finales se eyaculan cuando la erección esta cesando y el pene esta siendo retirado, de modo que es posible que sean depositados en la vagina (Hafez, 2000).

El proceso de emisión es variable, debido a que el número de chorros por eyaculado varia de cinco a diez, con un promedio de ocho. Los primeros chorros se expulsan a alta presión en un flujo con salpicadura característica. Los últimos, acompañados de erección menguante y retiro del pene ocurren a baja presión. Del tiempo total de eyaculación, 24% corresponde a la emisión seminal en si; el resto comprende intervalos entre chorros sucesivos. Los tres primeros contienen 80% de los espermatozoides eyaculados (Hafez, 2000). El número total de

gametos y contenido de ergotioneina disminuye gradualmente en los chorros sucesivos. Los 4 a 10 chorros terminales, contienen bajas concentraciones de células espermáticas y ergotioneina (Hafez, 2000).

3. COLECCIÓN DE SEMEN

A pesar de que la colección de semen en el caballo es un procedimiento relativamente fácil, la calidad del eyaculado puede ser afectada dramáticamente por los procedimientos de colecta. La selección del tipo de vagina artificial se realizará de acuerdo con las preferencias del semental y del veterinario.

El caballo eyacula basado en la temperatura y presión. Por lo tanto estos dos parámetros tendrán que ser ajustados individualmente para cada animal. La temperatura de la vagina artificial (VA) previa a la colecta debe mantenerse en un rango de 42 a 48 grados centígrados. Una pequeña cantidad de lubricante no espermicida debería ser usado para la preparación de la vagina. Estudios recientes han demostrado que grandes cantidades de lubricantes solubles en agua pueden afectar la calidad del semen. La botella de colección ideal deberá ser aquella que pueda contener un filtro, que permita la separación de la fracción rica en espermatozoides y la fracción gelatinosa. El gel es descartado y solamente la fracción rica en espermatozoides es usada para la evaluación y la inseminación (Squires, 2006).

El sitio donde se realizara la colecta deberá ser del tamaño adecuado para permitir al caballo espacio para maniobrar así como para permitirle saltar. El

semen podrá ser colectado con el caballo montado sobre un maniquí o sobre una yegua. Sin importar el método utilizado, el lugar donde se para el caballo es muy importante, el cual en preferencia debe ser de un material que pueda ser desinfectado y limpio (Squires *et al*, 2001).

Una vez que la vagina artificial se encuentra en la temperatura correcta. El caballo es presentado a la yegua en celo, para provocar la erección, el cuerpo del pene así como el glande son lavados con agua tibia.

Se procede a la monta, y una vez sobre el maniquí o la yegua el pene del caballo es desviado hacia el interior de la vagina artificial.

La vagina artificial es sostenida en una posición ligeramente elevada para simular el ángulo del tracto reproductivo de la yegua. Se puede colocar una mano en la base del pene, sobre la uretra para sentir los flujos de semen a través de la uretra. Cuando se han sentido el paso de tres o cuatro flujos, la vagina artificial es bajada lentamente hasta ser colocada en una posición casi vertical al final del proceso de eyaculación. Esto permite que el semen se escurra a través del filtro hacia el fondo de la botella de colección. Una vez que el pene del caballo empieza a perder tono, y el caballo comienza a retroceder, la persona que realiza la colecta necesita mantener la vagina artificial en su lugar y ayudar al animal a bajarse manteniendo contacto con el flanco del animal.

Es muy importante vaciar aproximadamente dos tercios del agua de la vagina artificial inmediatamente después de la eyaculación. Esto disminuye la presión y facilita el drenaje del semen (Squires, 2006).

Es importante que el laboratorio donde se realizara el análisis del semen se encuentre cerca del lugar de colecta, para permitir que una vez removida la

botella de colección, la muestra pueda ser evaluada y procesada en el menor período de tiempo posible (Margo *et al*, 2001).

Vagina Artificial

Muchos tipos y modelos de vagina artificial (VA) se han desarrollado para colección de semen equino, las de uso más común en los programas de reproducción incluyen: la grande, robusta, pero muy pesada modelo Colorado, que mide 59 cm. de largo y 15 cm. de diámetro interno. Este modelo requiere ser llenada con 4.5 litros de agua a 60 grados centígrados para poder crear la presión y temperatura ideal de 46 grados centígrados, para estimular la eyaculación en la mayoría de caballos. El modelo colorado tiene la ventaja de ser aceptada por la mayoría de animales y retiene el calor mejor en climas fríos. Pero tiene la desventaja de ser muy pesada y difícil de manejar, especialmente al tratar de coleccionar animales caprichosos y no colaboradores.

El modelo de AV Missouri es más simple y fácil de usar, que el modelo Colorado, esta consiste en dos resistentes linners de látex- hule, en el interior de un empaque de cuero. Es de fácil manejo, ligera y también bastante aceptada por los caballos. Sin embargo tiende a perder calor rápidamente en días fríos (Allen, 2005).

También existen las vaginas artificiales de extremo abierto, desarrolladas originalmente en Polonia por los profesores Bielanski y Tischner, son llamadas: modelo Krakow, y su sucesora la AV modelo Cambridge, las dos consisten en un simple marco de estilo abierto hecho de metal o plástico que se encuentra rodeado en su interior de los linner de látex- hule. El extremo anterior de la AV es dejado abierto, para coleccionar el eyaculado en un vaso colector o ya sea que el

animal eyacule en el aire. Haciendo posible colectar únicamente las fracciones que son ricas en espermatozoides (primeros 3 a 5 pulsos). Estos modelos de extremo abierto permiten la visualización del proceso de eyaculación y permite colectar las diferentes fracciones del eyaculado, eliminando así el proceso de filtrado (Allen, 2005).

4. MANEJO DEL SEMEN

El objetivo de la colecta de semen equino, y su posterior procesamiento es el mantenimiento de la mayor cantidad de espermatozoides en condiciones viables por el mayor tiempo posible. Por lo que es importante el conocimiento de los agentes que pueden amenazar la supervivencia espermática entre los cuales se puede mencionar:

- *Luz ultra violeta*; La luz solar puede tener efectos deteriorantes en la sensitiva membrana externa de las células espermáticas causando alteraciones en el ADN (Dickson, 2003 b).
- *Shock térmico*; el espermatozoide equino es extremadamente sensible al shock por frío (o daño por enfriamiento) cuando es enfriado de 37 grados centígrados (temperatura corporal), a aproximadamente 8 grados, a una velocidad de enfriamiento mayor de 0.3 grados centígrados menos por minuto. Los efectos de tasas de enfriamiento mayores a 0.3 grados centígrados por minuto incluyen, patrones de desplazamiento espermático anormal (circular o en retroceso), pérdida de motilidad, daño acrosomal, daño en la

membrana plasmática, reducción del metabolismo y pérdida de los componentes intracelulares (Devireddy *et al*, 2002) (Moran *et al*, 2000).

- *Estrés osmótico*; el espermatozoide equino es muy sensible a los cambios en la osmolaridad del medio, y pierden permanentemente la motilidad al ser expuestos tanto a estrés hiper-osmótico así como hipo-osmótico (Devireddy *et al*, 2002). La motilidad declina rápidamente bajo condiciones hiper-osmóticas, a pesar de no existir cambios en la integridad de la membrana a 600 mOsm. Mientras que bajo condiciones hipo-osmóticas tanto la motilidad como la integridad de la membrana plasmática se ven afectadas. Se sugiere que la osmolaridad crítica para el espermatozoide equino es aproximadamente 50 mOsm (Ball *et al*, 2001).
- *Daño mecánico*; el daño mecánico causado por manejo inadecuado y brusco, puede provocar la muerte de un gran número de células espermáticas así como ruptura de colas y decapitación (Brinsko *et al*, 2000).
- *Materiales espermicidas*; los lubricantes usados en la colecta, el agua contenida en la vagina artificial y el hule de los émbolos de jeringas de inseminación de llegar a tener contacto directo con el semen podrían tener un efecto espermicida (Brinsko *et al*, 2000).

5. EVALUACIÓN DE SEMEN Y ESPERMA

ESPERMATOZOIDE EQUINO

Los espermatozoides consisten en cabeza y cola, y está completamente rodeado de membrana plasmática. La longitud del espermatozoide es de $87,85 \pm 1.02 \mu\text{m}$ (Juhasz, 2000).

Membrana plasmática

La membrana plasmática está compuesta de lípidos, principalmente fosfolípidos, colesterol y proteínas. Los lípidos están alineados en una doble capa localizando sus extremos hidrofílicos externamente y la capa de cadenas grasas hacia el interior. Las proteínas se encuentran entrecruzadas con los lípidos como proteínas integrales y periféricas (Juhasz, 2000). Algunas de las cuales actúan como canales a través de la membrana o son receptores de superficie. Muchas proteínas en la superficie externa contienen cadenas de carbohidratos, las cuales pueden ligarse con otras proteínas del medio. (Hafez, 2000).

La proporción de colesterol y fosfolípidos y la naturaleza de estos últimos determinan la flexibilidad de la membrana la cual es “fluida” a temperatura ambiente (Juhasz, 2000).

Cabeza

La cabeza del espermatozoide equino es elíptica, ligeramente mas gruesa en la parte posterior, su longitud es de $6.62 \pm 0.02 \mu\text{m}$ y su ancho de $3,26 \pm 0,19 \mu\text{m}$. La

cabeza incluye el núcleo, el acrosoma la lámina postacrosomal y la fosa de implantación (Juhasz, 2000).

El núcleo contiene una cromatina muy concentrada, el ADN y su cerrada doble capa de membrana nuclear. Las dos terceras partes del núcleo está cubierto por el acrosoma, que es una vesícula especial que contiene glicolípidos y enzimas hidrolíticas (Slusher, 1992). El acrosoma está cubierto por una membrana interna y externa, la cual puede ser dividida en segmentos; apical, principal y ecuatorial. Siendo el segmento ecuatorial el que no contiene enzimas hidrolíticas y no interviene en la reacción acrosomal, pero la membrana plasmática de esta área se fusiona con la membrana del oocito (Juhasz, 2000).

La fosa de implantación es el lugar donde la cola se une a la cabeza y esta posición es usualmente abaxial en el caballo (Slusher, 1992).

Cola

El largo de la cola del espermatozoide equino es de $80,40 \pm 6,16 \mu\text{m}$. La cola del espermatozoide incluye el cuello, la porción; media, principal y terminal.

Siendo el cuello la conexión entre la cabeza y porción media y posee el centeolo (Slusher, 1992). Esta región del espermatozoide es muy frágil sin embargo este es el sitio donde el movimiento de la cola se inicia (Juhasz, 2000).

La porción media es la parte más gruesa de la cola, esta caracterizada por mitocondrias alineadas elípticamente que contienen enzimas y cofactores para la producción de ATP. Ubicándose centralmente a las mitocondrias están nueve fibras densas que se extienden desde el cuello, atravesando por completo la parte media y la mayoría de la porción principal. Las fibras densas no se contraen sin

embargo proveen de rigidez y flexibilidad al mismo tiempo sirven para el movimiento flagelar (Dickson y Love, 2003)

El axoma consiste en un par central de microtúbulos, rodeados de nueve dobletes microtubulares, el axoma se extiende desde el cuello, continúa por la porción media y termina en la porción terminal.

La porción principal de la cola es la parte más larga del espermatozoide, esta contiene el axonema, las fibras densas y la cobertura fibrosa. Además está es la porción encargada de la flexibilidad durante el movimiento.

La porción terminal, esta únicamente compuesta por el axonema o microtúbulos simples rodeados de membrana plasmática (Juhasz, 2000).

Evaluación de semen

La evaluación del semen equino debe comenzar inmediatamente después de la colecta. Es imperativo prevenir cualquier influencia medioambiental en el semen antes o durante la evaluación. Todos los utensilios y equipo que contiene el eyaculado debe ser libre de sustancias tóxicas, limpio y estéril, y de contener espermatozoides vivos debe mantenerse a 37 grados centígrados (Cowel and Tyler, 1992).

Evaluación macroscópica

Inicialmente el gel (o porción gelatinosa) debe ser separado de la porción espermática del eyaculado en el laboratorio por aspiración con una jeringuilla, si un filtro no fue colocado en la vagina artificial durante la colecta. La filtración también es requerida para remover objetos extraños como esmegma, pelo, tierra y suciedad.

Una vez separada la porción espermática del gel, se procederá a la evaluación macroscópica, la cual provee una información estimada de la concentración y calidad del semen (Dickson y Love, 2003), procediendo a evaluar:

- *Volumen*; a pesar de que el volumen por si solo no es un factor determinante en la fertilidad, es usado en el cálculo del número total de espermatozoides en el eyaculado (Dickson y Love, 1992). A pesar de que el volumen puede variar de acuerdo a la estación reproductiva así como por el uso como reproductor la media según Dowset *et al*, 2000, es de 45 ± 30 ml.
- *Aspecto*; el semen fresco equino tiene una apariencia opaca gris blanquecina. La detección de cambios en el color que puedan ser asociadas a la presencia de detritos, sangre u orina, pueden afectar severamente la calidad del semen e indicar un desorden en el tracto reproductivo o urinario (Juhasz *et al*, 2000).

Evaluación microscópica

- *Concentración*; la determinación de la concentración espermática de la porción libre de gel, es importante, gracias a que este parámetro es usado para determinar la dosis inseminante correcta, o para calcular el volumen de las muestras para los diferentes ensayos. La concentración puede ser determinada por hematocitómetro o

espectrofotómetro (Juhasz *et al*, 2000). La concentración media es de 164 ± 39 (10^6 /ml) (Dowset *et al*, 2000).

- *Número total de espermatozoides*; es calculado como el producto de la concentración y el volumen, es probable que esta es uno de los parámetros más importantes para determinar la fertilidad del seminal. El número total de espermatozoides por eyaculado puede ser afectado por un sin número de factores los cuales incluyen; frecuencia de la eyaculación, edad, tamaño testicular, tamaño de las reservas espermáticas extragonadales y varias formas de enfermedades reproductivas (Dickson y Love, 2003). El número total de espermatozoides según Dowset *et al* 2000, es de $11.9 \pm 9 \times 10^9$.
- *Motilidad*; la motilidad tanto en semen extendido o sin extender es considerado como una prueba fundamental para evaluar la capacidad fertilizante del eyaculado. Siendo la motilidad la primera variable microscópica a evaluar, ya que existe una alta correlación entre el porcentaje de motilidad y fertilidad (Hafez, 2000). Los parámetros mas importantes que entran en esta evaluación son: velocidad, linealidad, porcentaje de móviles sobre cierta velocidad y movimiento lateral oscilatorio (Juhasz *et al*, 2000). Existen varios métodos se evaluación de la motilidad como: fotomicrografía de tiempo pausado, videomicrografía de cuadro a cuadro, espectrofotometría o análisis computarizado. Sin embargo estos métodos son considerados tediosos y costosos para su uso

rutinario. Es por eso que el análisis subjetivo de la motilidad realizado por personal entrenado con un microscopio, es el método más aceptado en la mayoría de laboratorios de reproducción ya que cuenta con ventajas como: confiabilidad si el observador es experimentado, simplicidad, rapidez en su ejecución, bajo costo y posibilidad de observar la velocidad de las células individuales. Siendo su única desventaja su subjetividad (Dickson y Love, 2000).

La motilidad de los espermatozoides del eyaculado o de la suspensión diluida se valora en varios campos del microscopio de luz, ya que los espermatozoides tienden a aglutinarse. El porcentaje de células con movimiento independiente se calcula usando la magnificación de 400 x, la preparación ha de ser mantenida o calentada a 37 grados centígrados. La preparación con semen fresco se hace mediante la extensión delgada de una gota de muestra en el portaobjetos. Se puede valorar el porcentaje de espermatozoides móviles de acuerdo a si 1 de cada 2 o 2 de cada 3 espermatozoides se esta moviendo en línea recta, la motilidad se encontrara entre 50 % y 66%. De la misma forma si 2 de cada 3 o 3 de cada 4 espermatozoides se mueven, entonces se podrá calificar la motilidad entre 66% y 75% (Cowel y Tyler, 1992).

- *Motilidad progresiva*; el porcentaje de espermatozoides progresando con motilidad vigorosa debe ser determinada en pocos minutos posterior a la colecta, de ser posible debe ser mantenido a 37 grados centígrados. El semen deberá ser examinado usando

magnificación de 400x. Esta evaluación consiste en la visualización del viaje de un espermatozoide individual en línea recta por el campo microscópico, el movimiento en pequeños círculos, así como la aglutinación, o inmovilidad debe ser clasificadas como motilidad no viable. La motilidad y motilidad progresiva son los parámetros mas relacionados a la fertilidad (Margo *et al*, 2001).

La determinación de los porcentajes de motilidad progresiva a pesar de ser una evaluación subjetiva, y con un alto porcentaje de variación entre observadores. Sin embargo provee al investigador de un valor cuantitativo de la calidad del movimiento de los espermatozoides (Morrell, 2006).

Para realizar esta evaluación se observa la porción media de la muestra, y se realiza un recorrido rápido a través de toda la placa para la determinación de las propiedades del desplazamiento espermático. Para el análisis detenido se estima si 1 de cada 2, 1 de cada 3, 1 de cada 4 y 1 de cada 5 espermatozoides se encuentran moviéndose progresivamente a través del campo de visión. Esto provee un porcentaje subjetivo estimado de la motilidad progresiva en proporción con el número total de espermatozoides (Cowel y Tyler, 1992).

Los decrecimientos en la motilidad progresiva pueden ser provocados por eyaculaciones infrecuentes (almacenamiento prolongado y envejecimiento espermático), otros factores que pueden afectar adversamente este porcentaje puede incluir la

presencia de bacterias, variación en la temperatura, daño mecánico y residuos químicos o tóxicos en el equipo (Cowel y Tyler, 1992).

- *Morfología*; la morfología o estructura del espermatozoide es típicamente examinada con un microscopio de luz con una magnificación de 1000x. Al menos 100 espermatozoides deben ser evaluados para evidenciar defectos morfológicos. Las características de la morfología espermática pueden ser examinadas por: no tinción, bufferadas en formol o suspensiones salinas y por tinción. Las técnicas de tinción más frecuentemente usadas son: eosina-nigrosina, eosina- anilina azul, sperma y la tinción Giemsa. Las muestras no teñidas pueden ser analizadas en un microscopio de fase de contraste, mientras que el caso de muestras teñidas puede ser utilizado un microscopio de luz brillante. Las anomalías en la morfología espermática tradicionalmente se han clasificado como primarias, secundarias y terciarias. Las anomalías primarias están asociadas con un defecto en la espermatogénesis por lo tanto son de origen testicular. Las anomalías secundarias son creadas en el sistema de conductos extratesticulares. Finalmente, las anomalías terciarias se desarrollan in Vitro como resultado de una colecta o manejo inapropiado. Actualmente los defectos morfológicos también son estudiados de acuerdo a la localización (acrosoma, citoplasma, parte media, cola, etc.), para evitar así presunciones erróneas del origen del defecto (Malmgren, 2002).

Siendo la media de espermatozoides normales según Dowset *et al*, (2000) de 51 ± 15 %.

6. TRANSPORTE DE SEMEN EQUINO 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 (Varner *et al* 2003). Demostrando ser importante para aumentar la supervivencia espermática durante el proceso de enfriamiento y transporte los siguientes lineamientos:

- *Diluir el semen con diluyentes (Semen extenders)*; El semen es extendido para prolongar el tiempo de vida espermática en los sistemas de almacenaje artificiales. Sin los buffers incorporados en los extenders el ácido láctico del metabolismo espermático se acumula en el plasma seminal y los espermatozoides mueren rápidamente. A una temperatura de refrigeración 4 a 6 grados centígrados el semen extendido, tendrá sustentablemente mayor tiempo de supervivencia que el semen no extendido (Lofstedt, 2003). Los diluyentes o semen extenders 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 y las proteínas de la leche además actúan como buffers de

los cambios de pH que ocurren durante el almacenamiento. 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 amikacina](#) mantuvo el mayor nivel de motilidad espermática, proveyendo además el mayor espectro de actividad antibacteriana en semen refrigerado a 5 grados centígrados por 48 horas (Varner *et al*, 2003). Sin embargo el/los antibióticos mas 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 estéril 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, diluyente: semen, hasta una dilución final de $25 - 50 \times 10^6$ espermatozoides /ml antes del almacenamiento (Jasko *et al*, 1991).

- *Remoción de plasma seminal*; se ha determinado que la remoción parcial del plasma seminal (muestras en las cuales se dejó del 5 a 20% de plasma seminal) previo el almacenamiento, mejora la motilidad y motilidad progresiva espermática comparado con la

remoción total de este, después del almacenamiento a 5 grados centígrados por 24 horas. (Brinsko *et al*, 2000b).

Sin embargo si la proporción del plasma seminal que es dejado supera el 20 %, la motilidad espermática decrece durante el almacenamiento (Jasko *et al*, 1991). A pesar de que varios estudios han demostrado el efecto negativo del plasma seminal durante el almacenamiento y procesos de refrigeración, existe también evidencia de su rol protector. Ya que se observó una notable reducción de la motilidad post almacenamiento cuando el porcentaje remanente de plasma seminal se reduce al 2% (Kareskoski *et al*, 2006).

Entre las funciones fisiológicas que cumple el plasma seminal está el proceso de capacitación. Los componentes del plasma seminal previenen el daño espermático por medio de la estabilización de la membrana espermática (Kareskoski *et al*, 2006).

- *Centrifugación*; La técnica de la centrifugación esta basada en los diferentes gradientes de densidad de los distintos tipos de células y que las células se mueven hacia la estabilización de su gradiente de concentración. Los espermatozoides tienen una densidad diferente, de las células epiteliales, leucocitos, bacterias y detritos, por lo que pueden ser separadas de los demás componentes del eyaculado. Como los espermatozoides móviles se orientarán por si solos en la dirección de la fuerza de centrifugación, formarán un condensado o pellet mas fácilmente que aquellos espermatozoides inmóviles. Los

espermatozoides inmaduros, viejos o con daño en su ADN permanecerán en las capas superiores o en las interfases, por lo que la población del pellet será conformada por aquellos espermatozoides móviles y fértiles (Morrell, 2006).

Brinsko *et al* 2000b concluyó que la centrifugación y remoción parcial del plasma seminal previa a la refrigeración y empaquetamiento es beneficioso para aquellos sementales cuyos eyaculados sufren de reducción en su motilidad progresiva, cuando eran procesados de manera convencional (sin centrifugación y remoción de plasma seminal). Weiss *et al* en el 2004, en su estudio determinó que la fuerza centrífuga (F_g) a utilizar debe variar en un rango de $350 \times F_g$ a $1800 \times F_g$, ya que a fuerzas G superiores, se incrementa la muerte espermática causada por fraccionamiento y ruptura de membrana plasmática, existiendo gran variabilidad según el semental.

- *Curva de enfriamiento*; 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 $-0,05^{\circ}\text{C}$ a $-0,1^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ para maximizar la motilidad espermática (Devireddy *et al*, 2002) (Moran *et al*, 2000).
- *Temperatura de almacenamiento*; Se a demostrado que la motilidad progresiva del semen equino sometido a refrigeración es adecuadamente mantenida en un rango de 4 a 6 grados centígrados

a comparación que aquellas muestras mantenidas a 15 grados centígrados (considerado temperatura ambiente media) (Dickson, 2003b). Una temperatura de almacenamiento de 4 – 6 grados centígrados es preferible siempre que se logre con una curva de descenso relativamente lento (Lofstedt, 2003).

Transportadores

En la actualidad existen varios contenedores en el mercado que son específicamente diseñados para el transporte de semen equino sometido a refrigeración. El Equitainer™ (Hamilton Research, South Hamilton, Estados Unidos), es al momento el transportador de más amplia utilización. Existiendo también transportadores menos costosos y desechables para el transporte de semen equino. Todos estos tipos de contenedores son de enfriamiento pasivo, que ofrecen distintas tasas de enfriamiento (Dickson, 2003b). Un estudio comparativo de estos tipos de contenedores, realizado por Brinsko *et al* en el año 2000c, en el cual los sometió a temperaturas extremas durante transporte aéreo y terrestre, demostró que la motilidad progresiva era adecuadamente mantenida en ambos transportadores de semen cuando no eran sometidos a temperaturas extremas (entre 10 a 37 grados centígrados). Sugiriendo además que el Equitainer™ sería el transportador más apropiado para temperaturas extremas, ya que es capaz de mantener las condiciones apropiadas (4 a 6 grados centígrados) por más tiempo.

Equitainer™

A finales de la década del 80, la compañía Hamilton Research Inc. (Massachussets, Estados Unidos) desarrolló el contenedor Equitainer, para el transporte de semen equino. Este contenedor posee la característica de proveer la tasa de enfriamiento de -0.3 grados centígrados por minuto, y estabilizar la temperatura entre 4 a 5 grados centígrados en un promedio de 10 horas y manteniendo la temperatura por casi 72 horas (Lofstedt, 2003).

La tecnología del Equitainer™ trabaja por conducción térmica, en el cual el calor es transferido entre dos objetos solidos en contacto con el otro. Cuando el isothermalizer es colocado sobre las latas de enfriamiento, el calor es transferido de los tubos, hacia el isothermalizer, a través de la superficie de contacto (Hamilton Research Inc., 2006)

Especificaciones físicas

El Equitainer™ está construido por polietileno moldeado y copolimero. El anillo de hule para proveer la capacidad aislante y mantenimiento de la temperatura interna.

- Dimensiones: 15.5 pulgadas de alto, 10 pulgadas de ancho.
- Peso (Cargado): 9 libras (Hamilton Research, 2006)

Componentes

- Isothermalizer; es la parte fundamental del sistema ya que permite el enfriamiento del semen en una taza precisamente controlada, y mantiene la temperatura hasta por 70 horas.
- Latas de congelamiento; son colocadas en el fondo del Equitainer™, y contienen material no toxico, no inflamable.

- Tubos de centrifugación (Hamilton Research, 2006).

METODOLOGÍA

El objetivo de este estudio fue el comprobar el efecto que tiene la centrifugación (diferente fuerza centrífuga (F_g) y tiempo), sobre la motilidad espermática del semen equino refrigerado por 24 horas.

Para el efecto se planteó las siguientes hipótesis:

- La Fg y el tiempo de centrifugación tienen un efecto sobre la motilidad espermática del semen mantenido entre 4 a 6 grados centígrados por 24 horas. ($H_{a1} = \Delta MOT_{fg0 t0} \neq \Delta MOT_{fg600 \times 5min} \neq \Delta MOT_{fg600 \times 10min} \neq \Delta MOT_{fg600 \times 15min} \neq \Delta MOT_{fg1000 \times 5min} \neq \Delta MOT_{fg1000 \times 10min} \neq \Delta MOT_{fg1000 \times 15min}$).
- A mayor Fg y tiempo de centrifugación se obtendrán mejores resultados en el mantenimiento de la motilidad espermática del semen equino sometido a refrigeración por 24 horas ($H_{a2} = \Delta MOT_{fg0 t0} < \Delta MOT_{fg600 \times 5min} < \Delta MOT_{fg600 \times 10min} < \Delta MOT_{fg600 \times 15min} < \Delta MOT_{fg1000 \times 5min} < \Delta MOT_{fg1000 \times 10min} < \Delta MOT_{fg1000 \times 15min}$).

Población

Se considera a la población todos los caballos machos adultos, enteros, que son sometidos a procesos de reproducción artificial usando refrigeración y almacenamiento de semen.

Localización

La investigación fue realizada en las instalaciones de Agropecuaria Guaytan, con los caballos de propiedad del Dr. Galo Saltos.

Los animales se encuentran en el sector Comunidad agrícola Tanda, Parroquia Tocachi, Cantón Pedro Moncayo, provincia de Pichincha. A una altura de 2200 metros sobre el nivel del mar.

Unidades experimentales

Se utilizaron dos caballos machos enteros clínicamente sanos

Historial manejo

La primera unidad experimental es un caballo de 4.6 años macho entero raza árabe, con un peso aproximado de 400 kg.

La segunda unidad experimental es un caballo macho entero pura raza inglés de 4.3 años, con un peso aproximado de 500 kg.

Los dos caballos machos fueron criados bajo el mismo sistema de crianza (Crianza realizada en potrero con una mezcla forrajera de kikuyo y árboles de algarrobo, destete a los 7 meses, con desparasitaciones cada 2 meses hasta los 6 meses, posteriormente desparasitaciones con intervalos de 3 meses hasta cumplir el año).

Los animales han sido sometidos a similares condiciones de manejo; recibiendo desparasitaciones periódicas cada 4 meses, pruebas anuales de anemia infecciosa equina y herrado cada 6 semanas. Durante la duración del estudio recibieron la alimentación habitual que consta de: paca de alfalfa 2 Kg al día, alimento balanceado 2 Kg al día (Alimento Derby mantenimiento, Pronaca) con suplementación vitamínica (Pecutrin, Bayer) de 15 gramos día y alfalfa fresca 5 Kg al día.

Se mantuvieron iguales condiciones de ejercicio el cual consiste en 45 minutos de trabajo a la cuerda al día.

Las unidades experimentales fueron sometidas a un exámen clínico completo para descartar cualquier tipo de enfermedad. Se realizaron tomas de muestras sanguíneas para la realización de hemográma, los cuales no mostraron indicios de enfermedad, ni procesos inflamatorios al presente momento, en ninguna de las unidades experimentales. También se realizó el estudio de suero sanguíneo para anemia infecciosa equina, en el Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical Izquieta Pérez, en el mes de abril del 2006, siendo ambos reportes negativos.

Finalmente las dos unidades experimentales fueron probadas previamente como reproductores, por monta natural y concepción en 4 y 3 yeguas para el caballo árabe e inglés respectivamente. Previo el inicio del estudio los sementales fueron sometidos a un exámen reproductivo que comprendió la valoración del aparato reproductivo externo (sin encontrar anormalidades), y de la realización de colectas para ser sometidas a análisis y procesos de refrigeración de semen para comprobar su resistencia al almacenamiento de 4 a 6 grados centígrados.

Se realizaron las colectas fue entre los meses octubre y noviembre del 2006.

Número de muestras

Se realizaron 14 colectas por caballo, con un intervalo de 48 horas entre cada colecta, cuyas muestras fueron asignadas sucesivamente a cada tratamiento, de tal manera que se destinaron 2 muestras por caballo para cada tratamiento (Tratamiento #1: sin centrifugación, Tratamiento #2: 600 Fg x 5min, Tratamiento #3: 600 Fg x 10min, Tratamiento #4: 600 Fg x 15min, Tratamiento #5: 1000 Fg x 5min, Tratamiento #6: 1000 Fg x 10min, Tratamiento #7: 1000 Fg x 15min).

Diseño experimental

Se utilizó un diseño de factorial 2 x 3 con dos replicas. Existiendo dos factores de estudio: Fuerza centrífuga (Fg), y tiempo de centrifugación. Los niveles a los que se estudio cada factor fueron:

<u>Factor</u>	<u>Nivel</u>
<i>Fuerza centrífuga (g)</i>	0
	600
	1000
<i>Tiempo (min)</i>	0
	5
	10
	15

Diseño de tratamientos

El diseño de los tratamientos fue factorial incompleto, por existir la imposibilidad de considerar el nivel 0 de cada factor con los demás niveles del otro factor.

Materiales

Campo

- Vagina artificial modelo colorado, ARS (Animal Reproduction Systems, California, Estados Unidos)
- Linnars desechables para vagina artificial modelo colorado, ARS (Animal Reproduction Systems, California, Estados Unidos) codigo: SAVL – 102/25.
- Gel no espermicida, lubricante estéril, Priority Care, Priority Inc. Illinois, Estados Unidos.
- Filtros desechables de nylon de 3.5 pulgadas, ARS (Animal Reproduction Systems, California, Estados Unidos) codigo: SAVF – 102/25.
- Vasos desechables de recepción de semen estériles, 150 mililitros. Registro sanitario 00584 Mac 0999 (Ecuador)
- Termómetro
- Equitainer™ I Tube style (Hamilton Research Inc., Massachusetts, Estados Unidos)

Laboratorio

- E-Z mixín – “CST” equine semen extender (Animal Reproduction Systems ARS™, California, Estados Unidos)
- Centrífuga Jackson para tubos de 50 cc, # 1247 (Oto Hess S.A Argentina).
- Pipetas de 1 ml
- Portaobjetos

- Cubreobjetos
- Microscopio de luz
- Contador manual
- Pipeta para glóbulos rojos o de Thomas
- Absorbedor
- Tubos para centrífuga
- Hematocitómetro
- Cronómetro
- Tubos Corning para Equitainer (Hamilton Research Inc., Massachussets, Estados Unidos)
- Agua caliente a 37 grados centígrados
- Termómetro

Recolección de información

Evaluación pre refrigerado

- Motilidad
- Motilidad progresiva
- Velocidad espermática (escala arbitraria 5 veloz, 4 rápido, 3 lento, 2 escaso, 1 esporádico y 0 sin movimiento)

Evaluación post refrigerado

- Motilidad
- Motilidad progresiva

- Velocidad espermática

MÉTODO

- Un par de yeguas fueron enceladas por inyección de un análogo de la prostaglandina F₂ alfa (Iliren® Intervet), con una dosis de 3 ml por vía intramuscular (Cada 1 ml de solución contiene 0.196 mg de tiaprost trometamol, equivalente a 0.150 mg de tiaprost, y 2 mg de cloresol como antimicrobiano). Siendo inyectadas en fase lútea, y presentando celos entre los 3 a 4 días posteriores a la inyección.
- Las colectas a los caballos fueron realizadas con un intervalo de 48 horas entre colecta y colecta.
- Se preparó la vagina artificial, modelo Colorado y demás materiales para la colecta y evaluación.
- Se procedió a la sujeción de la yegua y vendaje de la cola.
- Una vez probada la receptividad de la yegua, se procedió a la estimulación del macho hasta conseguir una erección adecuada.
- A continuación se realizó el lavado del macho, con agua tibia y algodón. Para la eliminación de suciedad y esmegma.
- La colección del semen equino se realizó en una vagina artificial modelo Colorado.
- Cada caballo fue colectado por 14 ocasiones de acuerdo al siguiente cronograma.

Tabla # 2., Descripción de los tratamientos realizados

DÍAS	1 - 15	3 - 17	5 - 19	7 - 21	9 - 23	11 - 25	13 - 27
TRATAMIENTO	1	2	3	4	5	6	7
FUERZA (g)	0	600	600	600	1000	1000	1000
TIEMPO min	0	5	10	15	5	10	15

- Se realizó la evaluación pre refrigerado de cada muestra.
- Cada eyaculado fué extendido en E-Z mixín – “CST” equine semen extender, Animal Reproduction Systems ARS™ (Componentes: Glucosa, leche en polvo sin grasa y sulfato de amikacina) previamente calentado a baño maría hasta alcanzar 37 grados centígrados, con una dilución de 2:1 o 3:1 (Extender- semen respectivamente).
- Se dividió en alícuotas para ser centrifugadas en tubos cónicos de 50 ml.
- Se calibró la centrifuga y a continuación se procedió a centrifugar los tubos colocándolos equidistantes en los compartimentos respectivos, a la fuerza centrifuga (Fg) respectiva al tratamiento.
- Posterior a la centrifugación, se extrajo 40 ml de sobrenadante, lo que corresponde a una extracción del 80% de plasma seminal, este es eliminado y a continuación el semen fue resuspendido en extender a 20 grados centígrados hasta completar un volumen final de 50 ml.
- Se almacenó el semen en el Equitainer™ I a cuatro grados centígrados siguiendo las indicaciones de empaquetamiento del fabricante del Equitainer™ (Hamilton Research Inc, Massachussets, Estados Unidos).

- Cada Equitainer™ contendrá la muestra de cada animal, según el tratamiento establecido.
- Las muestras fueron mantenidas en un cuarto a temperatura ambiente.
- Cada muestra fue evaluada a las 24 horas post colecta (evaluación post refrigerado), siendo previamente calentadas por baño maría a 37 grados centígrados por 20 minutos para asegurar la máxima motilidad espermática al momento de ser analizadas.

Empaquetamiento del semen en el Equitainer™ (Hamilton Inc, 2006)

1. Una vez que el semen fue extendido se procedió a llenar con este los dos tubos hasta alcanzar su capacidad máxima de 50 ml.
2. Los tubos fueron colocados en el isothermalizer.
3. Se ubicaron las dos latas de enfriamiento en el Equitainer™ (previamente sometidas a congelamiento por al menos 24 horas, teniendo precaución de hacerlo en la posición indicada).
4. Se procedió a posicionar el isothermalizer cargado con los tubos corning de 50 ml, que contienen las muestras, sobre las dos latas de enfriamiento
5. Se cierra la tapa de seguridad

Análisis estadístico

El análisis del diseño factorial se realizó por ANOVA, usando el método de mínimos cuadrados, con el paquete estadístico Minitab® Realease 14 Statistical Software, Minitab Inc. Las diferencias serán consideradas a un nivel de significancia de $P_{\infty} < 0.01$.

H_0 = La Fuerza g así como el tiempo de centrifugación no afectan la variación de la motilidad espermática del semen sometido a refrigeración por 24 horas.

($H_0 = \Delta MOT_{fg0 t0} = \Delta MOT_{fg600 \times 5min} = \Delta MOT_{fg600 \times 10min} = \Delta MOT_{fg600 \times 15min} = \Delta MOT_{fg1000 \times 5min} = \Delta MOT_{fg1000 \times 10min} = \Delta MOT_{fg1000 \times 15min}$).

H_a = A fuerza centrifuga por mayor tiempo se mantendrán mejores niveles de la motilidad espermática del semen sometido a refrigeración por 24 horas.

($H_a = \Delta MOT_{fg0 t0} < \Delta MOT_{fg600 \times 5min} < \Delta MOT_{fg600 \times 10min} < \Delta MOT_{fg600 \times 15min} < \Delta MOT_{fg1000 \times 5min} < \Delta MOT_{fg1000 \times 10min} < \Delta MOT_{fg1000 \times 15min}$).

RESULTADOS

Validación del experimento

El ensayo fue realizado a través de 14 colectas, por cada unidad experimental, con un intervalo de 48 horas entre colecta y colecta. Sin existir novedades durante el transcurso de las colectas, los animales no presentaron signos clínicos de enfermedad, no existió variación de peso y no mostraron comportamiento anormal.

El Equitainer™, se valido a través de pruebas con agua y avena (para simular la densidad del semen) en las cuales mostró un desempeño de acuerdo a las tablas de enfriamiento del fabricante (Hamilton Research Inc).

La centrifuga fue evaluada en el laboratorio de Docencia de Física Básica de la Escuela Politécnica Nacional, para validar que las fuerzas de centrifugación corresponden a las indicadas en el calibrador de la maquina.

Resultados el ensayo

Las unidades experimentales no mostraron diferencias en los análisis iniciales de motilidad espermática (MOT), motilidad progresiva (PMOT) y velocidad espermática de sus eyaculados ($P>0.05$), produciendo eyaculados dentro de los parámetros normales tanto de volumen como de concentración en todas las colectas (Hafez, 2000) (Tabla #3)

Tabla #3 Media de porcentajes en MOT, PMOT y velocidad espermática de muestras de semen fresco, entre colectas de las unidades experimentales Centrifugación y almacenamiento.

	Media datos iniciales		
	% MOTILIDAD	% MOTILIDAD PROGRESIVA	VELOCIDAD ESP
Colecta (1-8)	85,00	80,50	4,50
Colecta (2-9)	82,00	79,00	4,00
Colecta (3-10)	82,00	79,00	4,00
Colecta (4-11)	90,00	87,50	4,75
Colecta (5-12)	90,00	87,50	4,75
Colecta (6-13)	92,50	90,00	4,75
Colecta (7-14)	92,50	90,00	4,75

Al realizar los tratamientos:

- Tratamiento #1: no centrifugación.
- Tratamiento # 2: centrifugación a 600 Fg por 5 minutos.
- Tratamiento # 3: centrifugación a 600 Fg por 10 minutos.
- Tratamiento # 4: centrifugación a 600 Fg por 15 minutos.
- Tratamiento # 5: centrifugación a 1000 Fg por 5 minutos.
- Tratamiento # 6: centrifugación a 1000 Fg por 10 minutos.
- Tratamiento # 7: centrifugación a 1000 Fg por 15 minutos.

Para el análisis de los tratamientos se corrió un modelo de factores principales (o, 600 Fg y 1000 Fg) y se halló que existe diferencia entre 0 y 1000 Fg con un nivel de significancia $< 0,01$ (Tabla # 4).

Tabla #4 Media de los % de reducción de MOT y PMOT según el factor centrifugación (0, 600 Fg y 1000 Fg)

	0	600 Fg	1000 Fg	Error estándar	Nivel de sig
% Red MOT	29 ^a	21,3 ^a	48 ^b	9,1	0,01
% Red. PMOT	26,7 ^a	21,5 ^a	48,7 ^b	8,2	0,01

A, b Literales diferentes indican significancia ($<0,01$)

Se probó si existe interacción entre los factores fuerza centrífuga (Fg) y tiempo (T), y se halló que existe interacción a un nivel de significancia $<0,01$ (Grafico #1).

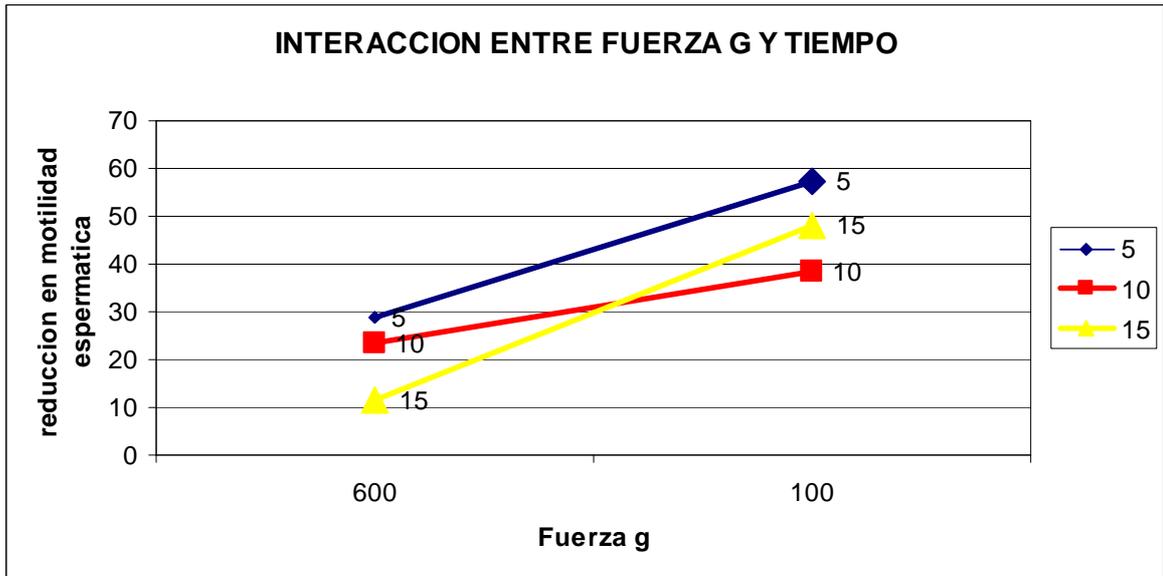


Grafico #1 Interacción entre Fuerza G y tiempo

Al determinar la interacción Fg y tiempo se probó también que la combinación que produce mejor mantenimiento en los porcentajes de motilidad espermática y motivad progresiva (menor reducción) es la combinación de 600 Fg por 15 minutos (Tabla #5).

Tabla #5 Media de los % de reducción de MOT y PMOT según tratamiento.

	600 Fg- 5min	600 Fg- 10min	600 Fg- 15min	1000Fg- 5min	1000 Fg- 10min	1000 Fg- 15min	Error estándar	Nivel sig
% red. MOT	29 ^{de}	23,5 ^d	11,5 ^c	57,5 ^a	38,5 ^{be}	48 ^{ab}	5,8	<0,01
% red. PMOT	30 ^{de}	23 ^d	11,5 ^c	57 ^a	40,5 ^{be}	48,5 ^{ab}	4,5	<0,01

A, b, c, d y e Literales diferentes indican significancia (<0,01)

DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio demuestran que la no centrifugación (Tratamiento #1) comparada con centrifugación a 1000 Fg presenta una menor reducción en los porcentajes de motilidad y motilidad espermática a una significancia del 0,01 (Tabla #4).

Estos efectos deteriorantes sobre la motilidad espermática de una mayor fuerza centrífuga (1000 Fg), se atribuyen tanto a un posible daño mecánico a las células espermáticas durante el proceso de centrifugación y durante la resuspensión del paquete espermático, el cual se dificulta a 1000 Fg.

Y ya que el objetivo de someter el semen a centrifugación es el permitir la separación de las células espermáticas del plasma seminal, según estudios realizados por Rota et al, 2004, Squires et al, 20001, Brinsko et al 2000b y Ferrer et al en el 2004, que han demostrado posee efectos deteriorantes sobre la motilidad y supervivencia el semen equino sometido a procesos de almacenamiento. El proceso en si de la centrifugación del semen equino puede tener efectos adversos (Brinsko et al 2000b). Al corroborar la existencia de la interacción entre fuerza centrífuga (Fg) y tiempo (T) (Grafico #1) a un nivel de significancia de 0,01. Por tanto se determina que los beneficios de la centrifugación están directamente relacionados con el tiempo y fuerza centrífuga (Fg) a la cual es sometido el semen y sus efectos dependen de la combinación entre estas dos variables.

Una vez que se determinó la interacción Fg – T se comprobó cual es la mejor combinación de estas (Tabla # 5). Siendo 600 Fg por 15 min (Tratamiento #4), la combinación que mostró un mejor mantenimiento de la motilidad y motilidad progresiva estadísticamente significativa ($P < 0,01$) del semen equino sometido a enfriamiento de 4 a 6 grados centígrados por 24 horas.

En este estudio se utilizaron animales que producen espermatozoides con una buena tolerancia a la refrigeración y almacenamiento. Al ser aplicados estos resultados en animales semen cuyos espermatozoides tengan motilidades marginales o muy bajas después de la refrigeración por 24 horas, se deberá tener consideraciones especiales en bases a muestreos previos.

En este estudio el número de animales fue reducido, logrando un buen control sobre factores tales como; alimentación, crianza, edad, localización geográfica, manejo (desparasitaciones y vacunación), estado reproductivo y de salud, trabajo y ejercicio con el afán de reducir el error estadístico. A la existencia de un superior número de animales, sugiero mayor experimentación para corroborar los resultados de este ensayo.

La aplicación de los resultados de este trabajo son de importancia para obtener protocolos de manejo de semen refrigerado mas eficientes que nos lleven a mejores resultados prácticos

CONCLUSIONES

Basándose en los resultados de este ensayo se puede llegar a las siguientes conclusiones:

- La centrifugación a 1000 Fg comparada con la no centrifugación, tiene un efecto adverso en el mantenimiento de la motilidad espermática del semen equino sometido a refrigeración.
- Los resultados del presente estudio indican existe una interacción entre la fuerza centrífuga y el tiempo. Siendo además la combinación de

centrifugación a 600 Fg, por 15 minutos la que presenta los mejores resultados en el mantenimiento de la motilidad espermática (MOT) y motilidad progresiva (PMOT) del semen equino refrigerado y almacenado por 24 horas.

RECOMENDACIONES

- La centrifugación así como la remoción de plasma seminal son procesos de delicado manejo, los cuales siempre deberán ser realizados por personal calificado en procedimientos de laboratorio y entrenado en el manejo de semen equino.
- Es de suma importancia, previa la refrigeración y transporte de una muestra de semen, se realice una colecta en la cual se puedan efectuar las pruebas y evaluaciones de refrigeración y motilidad necesarias para determinar el manejo óptimo que el semen requiere, para cumplir con los parámetros de calidad espermática, e inseminante.

- Los tratamientos sometidos a 1000 Fg mostraron una mayor compactación del paquete espermático lo que dificulta la resuspensión de este. También presentaron un mayor decrecimiento en los porcentajes de MOT y PMOT. Por lo que se sugiere no incrementar la Fg más allá de un rango de 600 Fg.
- Este estudio demostró la interacción entre Fg- Tiempo y que la combinación que presenta una menor reducción de la motilidad espermática y motilidad progresiva, es de 600 Fg por 15 min y por el contrario mayor fuerza centrífuga (1000 Fg) tiende a tener efecto deteriorante. Este sensible proceso de centrifugación debería ser indicado para aquellos caballos cuyos eyaculados sufran excesiva reducción en los porcentajes de MOT y PMOT, cuando son procesados de manera convencional y sometidos a refrigeración por 24 horas.

BIBLIOGRAFÍA

- Allen. The development and Application of the modern Reproductive Technologies to Horse Breeding, *Reprod Dom Anim.*2005;40:310-329.
- Amann. A review of anatomy and physiology of the stallion, *J Equine Vet Sci.* 1998;18:83-105.
- Amann. Maturation of spermatozoa, *Proc Inter Cong Anim Rerp Art Insem.* 2001;321- 328.
- Baas *et al.* Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoa, *J Reprod Fertil.* 1998;71:275-280.
- Ball *et al.* Osmotic Tolerance of equine Spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on Equine Sperm Motility, Viability and

Mitochondrial Membrane Potencial, Journal of Andrology. 2001;22:1061-1069.

- Bartels *et al.* Angiography of the corpus cavernosum penis in the pony stallion during erection and quiescence, Am J Vet Res. 2004;45:1464-1468.
- Brinsko SP, *et al.* Transporte de semen equino. Abril 2000a. <http://ivis.org/advances/reproduction/chilled semen/brinsko/chapter>.
- Brinsko *et al.* Effects of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine espermatozoal motility alter cooling and storage, Theriogenology. 2000b; 54:129-136.
- Brinsko *et al.* Effects of dead spermatozoa on motion characteristics and membrane integrity of live spermatozoa in fresh and cooled-stored equine semen, Theriogenology. 2003;59:735-742.
- Brinsko *et al.* Effects of transport container and ambient temperature on motion characteristics of equine spermatozoa, Theriogenology. 2000c; 53:1641-1655.
- Clay *et al.* Influences of season and artificial photoperiod on stallions: testicular size, seminal characteristics and sexual behavior, J Anim Sci. 2003; 74:517- 525.
- Clay *et al.* Effects of extenders, storage temperature and centrifugation on stallion spermatozoal motility and fertility, Int Cong Anim Reprod and AI. 2004;20:186.
- Colenbrander *et al.* The predictive value of Semen Analysis In the Evaluation of Stallion Fertility, Reprod Dom Anim. 2003;38:305-311.
- Cowel and Tyler. Cytology and Hematology of the horse. Editorial Mosby. USA. 1992.
- Devireddy *et al.* Measured effect of collection and cooling conditions on the motility and the water transport parameters at subzero temperatures of equine spermatozoa, Reproduction. 2002;124:643-648.

- Dickson D. Methods for evaluation of stallion for breeding soundness, 9° Congresso Nazionale Multisala sive, Pisa 1-2 Febrero 2003a.
- Dickson D. Thecnical considerations for cooltransported equine semen, 9° Congresso Nazionale Multisala sive, Pisa 1-2 Febrero 2003b.
- Dickson y Love. Semen evaluation, Department of Large animal Medicine and Surgery College Of veterinary Medicine Texas A&M publication. 2003; 39: 4475-5021.
- Douglas – Hamilton *et al.* A field study of the fertility of transported equine semen, Theriogenology. 2004;58:291-303.
- Dowset *et al.* The influence of age and breed on stallion semen, Theriogenology.2000;55:397- 412.
- Ferrer *et al.* Improvement of sperm recovery rates after centrifugation of stallion semen, Soc for Therio.2004;34:45-67.
- Hafez. Reproducción e inseminación artificial en animales. Séptima edición, Interamericana- McGrawhill, México; 199- 215. 2000.
- Hamilton Research Inc.
<http://www.equitainer.com/Equine/Equitainer/index.htm>, Octubre 2006.
- Heys *et al.* Historical review of theories on testicular descent, J Urology. 1995; 153: 754–767.
- Jasko *et al.* Effect of Seminal Plasma Dilution or Removal on Spermatozoa Motion Characteristics of Cooled Stallion Semen, Theriogenology. 1991; 35:1059-1067.
- Jhonson *et al.* Effect of age and season of establishment of spermatogenesis in the horse, J Reprod Fertil (Suppl). 2001;54:87-97.
- Kareskoski *et al.* Motility and plasma membrane integrity of spermatozoa in fractioned stallion ejaculates after storage, Reprod Dom Anim. 2006;41:33-38.

- Juhasz *et al.* Methods for semen and endocrinological evaluation of the stallion: a Review. Acta Vet. Brno.2000;69:247-259.

- Lofstedt. Using Fresh- transported and frozen Equine semen. Atlantic Veterinary College, University of Prince Edward Island Publication, Canada.2003.

- Malmgren. Sperm morphology in stallions in relation to fertility, Acta Vet Scd Suppl. 2002;98:39-47.

- Margo *et al.* How to evaluate semen in the field, AAEP Proceedinngs.2001; 47:412- 416.

- Moran *et al.* Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa, Theriogenology. 2000;53:999-1012.

- Morrell J. Update on Semen Technologies for animal Breeding, Reprod Dom Anim. 2006;41:63-67.

- Nickel *et al.* Male genital organs- general and comparative, seiferie Sack eds. Springer- Vergal. New York, pp 304- 350.1993.

- Picket *et al.* Effects of semen centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa, Fertil Steril. 2005;26:167-174.

- Rota *et al.* Studies on Motility and Fertility of Cooled Stallion Spermatozoa, Reprod Dom Anim. 2004; 39:103-109.

- Slusher S.H. Semen Evaluation. Cytology and Hematology of the Horse Cowel and Tyler, Editorial Mosby. USA, 1992.

- Springs – Mills. Accessory glands of the male reproductive tract. Ann Arbor Science Pubs (Abstract), 1979.

- Squires *et al.* Recommendations for cooled and frozen semen, Bulletin #11, Animal Reproduction And Biotechnology Laboratory, Colorado State University, Fort Collins Co. 2001.

- Squires. How to collect equine semen, Societa Italiana Veterinari per Equini, SIVE- XII congresso Multisala, Bologna Italy 2006.
- Thomas H. Infertility in stallions Evaluation of semen and sperm, California Thoroughbred. 2001;34:118-122.
- Varner DD, Scanlan CM, Thompson JA, Brumbaugh GW, Blanchard TL, Carlton CL, Johnson L. Bacteriology of preserved stallion semen and antibiotics in semen extenders, Theriogenology. 1998;50:559-573.
- Varner *et al.* Effects of semen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoa motility parameters, Theriogenology. 2003;53:709-723.
- Varner *et al.* Reproductive Anatomy and Physiology in diseases and management of breeding stallions, American Veterinary Publications. Goleta CA, pp 1- 59.1999.
- Webb *et al.* Comparison of Two Containers Used for Shipment of Stallion Semen, The professional animal Science. 2005;21: 13 -26.
- Weiss *et al.* The influence of centrifugation on quality and freezability of stallion semen, Schweiz arch Tierhelkd. 2004;146:285-293.
- Zidane *et al.* Fertility of fresh equine semen preserved for up 48 hours, J Reprod Fertil. 1991; 44 (Suppl):644.

